

Aus dem Institut für Allgemeine Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Karl-Heinz Grzeschik
Arbeitsgruppe für Molekulare Analyse erblicher Erkrankungen
Leiterin: Prof. Dr. Manuela C. Koch

**Assoziationsanalysen im
TGF α - und TGF β 3-Gen
bei Patienten mit
Lippen-Kiefer-Gaumenspalten
und
Gaumenspalten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nadine Petra Elisabeth Pletsch
geb. Dersch

aus Marburg

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am
22. Mai 2003.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referentin: Prof. Dr. Manuela C. Koch

Koreferent: Prof. Dr. Johannes Hebebrand

Und das Ende unseres Forschens
Ist, an den Ausgangspunkt zu kommen
Und zum erstenmal den Ort zu erkennen.
T. S. Eliot

Für Andi

1	Einleitung	1
1.1	Definition und Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten beim Menschen	1
1.2	Embryologie	3
1.3	Auf der Suche nach den verantwortlichen Genen	4
1.3.1	Studien an Tiermodellen	4
1.3.2	Expressionsstudien an Gewebekulturen	4
1.3.3	Die Kandidatengene	5
1.3.3.1	Die Gene <i>Tgfa</i> und <i>Egfr</i>	5
1.3.3.2	Das Gen <i>Tgfβ3</i>	6
1.4	Problemstellung der Arbeit	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Chemikalien	8
2.1.2	Enzyme, Fertigpuffer, Nucleinsäuren	9
2.1.3	Lösungen und Puffer	10
2.1.4	Geräte und Zubehör	11
2.1.5	Software	13
2.2	Nomenklatur der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (LKGS)	14
2.3	Probanden	14
2.3.1	Patienten	14
2.3.2	Kontrollen	16
2.4	Experimentelle Methoden	17
2.4.1	DNA-Isolation aus peripheren Blutleukozyten	17
2.4.2	DNA-Reinigung	18
2.4.3	DNA-Konzentrationsmessung	18
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.5.1	PCR-Optimierung	20
2.5.2	PCR zur Genotypisierung des <i>TGFα</i> -Locus	21
2.5.2.1	PCR zur Genotypisierung der 4 bp Deletion in Intron 5 des <i>TGFα</i> -Gens	21
2.5.2.2	PCR zur Genotypisierung der Mikrosatellitenregion D2S443	22
2.5.3	Genotypisierung im <i>TGFβ3</i> -Gen	23
2.5.3.1	PCR zur Genotypisierung der 6 bp Deletion im Promotorbereich des <i>TGFβ3</i> -Gens	23
2.5.3.2	PCR zur Genotypisierung des Basenaustausches C→T in Intron 4 des <i>TGFβ3</i> -Gens	24
2.6	Herstellung von Längenstandards	25
2.6.1	pBR322/ <i>MspI</i>	25
2.6.2	HindIII/ <i>EcoRI</i>	25
2.7	Gelelektrophorese	25
2.7.1	Agarosegelelektrophorese	26
2.7.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	26
2.8	Automatische DNA-Fragmentlängenbestimmung	28
2.9	Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)	29
2.9.1	Silbernitratfärbung von Polyacrylamidgelen	30
2.9.2	Analyse der aberranten SSCA-Fragmente	31
2.9.2.1	Isolierung der DNA-Fragmente aus SSCA-Gelen	32
2.9.2.2	Reamplifikation	32

2.9.2.3	Reinigung	32
2.9.2.4	Sequenzreaktion	33
2.9.2.5	Fällung	33
2.9.2.6	Elektrophorese der Produkte der Sequenzreaktion	34
2.10	Familienanalyse zur Haplotypisierung der Gene TGF α und TGF β 3	35
2.11	Statistische Methoden	36
2.11.1	Fall-Kontroll-Assoziationsstudien	36
2.11.2	Familienbasierte Assoziationsstudie	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Transforming Growth Factor alpha (TGF α)	39
3.1.1	Untersuchung des Polymorphismus wt \rightarrow Δ 4bp	39
3.1.1.1	Assoziationsanalyse	39
3.1.1.1.1	Fall-Kontroll-Vergleich bei LK/GS-Patienten	40
3.1.1.1.2	Fall-Kontroll-Vergleich bei GS-Patienten	41
3.1.1.2	Familienbasierte Assoziationsstudie	42
3.1.1.2.1	TDT für LK/GS-Familientrios	42
3.1.1.2.2	TDT für GS-Familientrios	43
3.1.1.3	Familiäre Häufung der LKGS	43
3.1.1.3.1	LK/GS-Patienten	43
3.1.1.3.2	GS-Patienten	44
3.1.1.4	Unilaterale und bilaterale LK/GS	44
3.1.2	Untersuchung der Mikrosatellitenregion D2S443	44
3.1.2.1	Allelfrequenzen der Mikrosatellitenregion D2S443	45
3.1.2.1.1	Allelfrequenzen bei LK/GS-Patienten	45
3.1.2.1.2	Allelfrequenzen bei GS-Patienten	46
3.1.2.2	Familienbasierte Assoziationsstudien	47
3.1.2.2.1	TDT für LK/GS-Familientrios	47
3.1.2.2.2	TDT für GS-Familientrios	49
3.1.3	Informationsgehalt der Familien	49
3.2	Transforming Growth Factor beta 3 (TGF β 3)	50
3.2.1	Untersuchung des Polymorphismus wt \rightarrow Δ 6bp	50
3.2.1.1	Assoziationsanalysen	50
3.2.1.1.1	Fall-Kontroll-Vergleich bei LK/GS-Patienten	51
3.2.1.1.2	Fall-Kontroll-Vergleich bei GS-Patienten	52
3.2.1.2	Familienbasierte Assoziationsstudien	53
3.2.1.2.1	TDT für LK/GS-Familientrios	53
3.2.1.2.2	TDT für GS-Familientrios	54
3.2.2	Untersuchung des Polymorphismus 68C \rightarrow T	54
3.2.2.1	Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) und Sequenzierung des Polymorphismus 68C \rightarrow T	54
3.2.2.2	Assoziationsanalysen	56
3.2.2.2.1	Fall-Kontroll-Vergleich bei LK/GS-Patienten	56
3.2.2.2.2	Fall-Kontroll-Vergleich bei GS-Patienten	57
3.2.2.3	Familienbasierte Assoziationsstudien	57
3.2.2.3.1	TDT für LK/GS-Familientrios	58
3.2.2.3.2	TDT für GS-Familientrios	58
3.3	Medikamenteneinnahme und Zigarettenrauchen der Mütter während der Schwangerschaft	59

3.3.1	LK/GS-Patienten	59
3.3.2	GS-Patienten	59
3.4	Kombination der Polymorphismen im $TGF\alpha$ - und $TGF\beta 3$ -Gen	59
4	Diskussion	61
4.1	Die Suche nach den verantwortlichen Genen	61
4.2	Assoziationsstudien	62
4.2.1	Fall-Kontroll-Assoziationsstudien	62
4.2.2	Familienbasierte Assoziationsstudien	62
4.3	Experimentelle Methoden	63
4.4	Das Kandidatengen $TGF\alpha$	64
4.4.1	Der Polymorphismus $wt \rightarrow \Delta 4bp$ im $TGF\alpha$ -Gen für LK/GS	65
4.4.1.1	Assoziationsstudien für $wt \rightarrow \Delta 4bp$ im $TGF\alpha$ -Gen bei LK/GS-Patienten	65
4.4.1.2	Assoziationsstudien für $wt \rightarrow \Delta 4bp$ im $TGF\alpha$ -Gen bei GS-Patienten	70
4.4.1.3	Die Rolle der Mutter	71
4.4.2	Genlocus $TGF\alpha$ und D2S443	73
4.4.2.1	Assoziationsstudien für D2S443 bei LK/GS- und GS-Patienten	73
4.5	Das Kandidatengen $TGF\beta 3$	75
4.5.1	Assoziationsstudien für $wt \rightarrow \Delta 6bp$ im $TGF\beta 3$ -Gen bei LK/GS und GS-Patienten	75
4.5.2	Assoziationsstudien für $68C \rightarrow T$ im $TGF\beta 3$ -Gen bei LK/GS und GS-Patienten	77
4.5.3	Die Rolle der Mutter	79
4.6	Gemeinsame Betrachtung der Polymorphismen der Gene $TGF\alpha$ und $TGF\beta 3$	80
4.7	Ausblick	82
5	Zusammenfassung	84
6	Abkürzungen und Symbole	86
6.1	Abkürzungsverzeichnis	86
6.2	Symbole	87
7	Literaturverzeichnis	88
8	Anhang	94
8.1	Fragebogen zur Ursachenforschung von LKGS für Eltern	94
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	96
8.3	Danksagung	97

1 Einleitung

1.1 Definition und Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten beim Menschen

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) gehören zu den häufigsten kongenitalen Fehlbildungen. In der deutschen Population beträgt die Prävalenz 1:600 – 1:800. Man unterscheidet aufgrund der Embryogenese Spalten des primären und des sekundären Gaumens. Spalten des primären Gaumens betreffen Lippe und Kiefer. Zusätzlich kann der sekundäre Gaumen gespalten sein (Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, LK/GS). Im angloamerikanischen Schrifttum werden diese Spalten als „cleft lip with or without cleft palate“ bezeichnet (CL/P, MIM 119 530). Bei isolierten Gaumenspalten (GS) handelt es sich ausschließlich um Spalten des sekundären Gaumens. In der angloamerikanischen Literatur werden diese Spalten als „cleft palate only“ (CPO, MIM 119 540) bezeichnet. LK/GS treten häufiger bei Jungen, GS dagegen häufiger bei Mädchen auf. Man vermutet, dass dies auf die spätere Fusion des sekundären Gaumens bei Mädchen zurückzuführen ist. Einseitige Spalten befinden sich meist auf der linken Seite und sind häufiger als bilaterale Spalten (Moore et al. 1996; Sadler 1998).

Die Ätiologie der LKGS ist weitgehend unbekannt. In 35 – 40% der Fälle tritt die LKGS in Kombination mit weiteren Fehlbildungen als Syndrom auf. Diese sogenannte syndromale LKGS wird entweder monogen vererbt (z.B. van der Woude-Syndrom) oder ist mit chromosomalen Erkrankungen (z.B. Trisomie 13) und Syndromen unbekannter Ätiologie (z.B. Goldenhar-Syndrom) assoziiert. In 60% kommt sie jedoch als nicht syndromale LKGS vor. In nur 25 – 30% der LK/GS- und 10 – 20% der GS-Fälle kann eine familiäre Häufung ohne erkennbaren monogenen Erbgang beobachtet werden. LK/GS und GS segregieren nicht gemeinsam in einer Familie, so dass die Theorie der unterschiedlichen embryonalen Entwicklung und damit der unterschiedlichen Ätiologie von LK/GS und GS bestärkt wird.

Hinweise für die Beteiligung genetischer Faktoren an der Ausbildung der LKGS liefern folgende Beobachtungen: 1. die familiäre Häufung und das erhöhte Erkrankungsrisiko für Kinder betroffener Eltern oder für Geschwister, 2. die höhere Konkordanz eineiiger Zwillinge gegenüber zweieiigen Zwillingen, 3. die unterschiedliche Prävalenz der nicht syndromalen LKGS in verschiedenen Populationen (Tab. 1.1, Wyszynski et al. 1996).

Tab. 1.1 Prävalenz der LK/GS in der US-amerikanischen Bevölkerung (Wyszynski et al. 1996)

Population (USA)	Prävalenz
indianische Bevölkerung/Montana (USA)	1:278
kaukasische Bevölkerung/USA	1:850
negroide Bevölkerung/USA	1:3333

Auch Umwelteinflüsse scheinen eine Rolle bei der Entstehung der nicht syndromalen LKGS zu spielen. Eine besondere Empfindlichkeit gegenüber derartigen Umwelteinflüssen besteht im Stadium der Blastozyste (Entwicklungstag 6), während der Primitivstreifenbildung (Entwicklungstag 14), im frühen Extremitätenknospungsstadium (5. Entwicklungswoche) und während der Aufrichtung der Gaumenplatten (Sadler 1998). Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass ein erhöhter Alkoholkonsum, Rauchen, verschiedene Medikamente (Phenytoin, hochdosiertes Vitamin A, Valproinsäure, Thalidomid) und die Exposition gegenüber Pestiziden (z.B. Dioxin) in der frühen Schwangerschaft das Risiko für eine LKGS erhöhen (Shutte et al. 1999). Hingegen senkt die Einnahme von Multivitaminpräparaten und Folsäure das Risiko der LKGS-Entstehung (Tolarova 1982; Khoury et al. 1996).

Gemeinsam ist den zur Aufklärung der Ätiologie der LKGS postulierten Modellen die Interaktion von Genen und Umweltfaktoren (polygener Erbgang, multifaktorielle Vererbung). Die multifaktorielle Vererbung ist aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen am wahrscheinlichsten. Erst die Interaktion vieler verschiedener prädisponierender Gene und Umweltfaktoren führt zu einem unvollständigen Schluss der Lippe, des Kiefers und/oder des Gaumens. Man vermutet, dass jeder Embryo eine gewisse Anfälligkeit für die Entwicklung einer LKGS besitzt. Diese Anfälligkeit kann gering oder stark ausgeprägt sein. Erst wenn eine kritische Schwelle (Addition der genetischen und umweltbedingten Faktoren) überschritten wird, die auch vom Geschlecht des Embryos abhängig ist, bildet sich eine LKGS.

1.2 Embryologie

Fehlbildungen des primären und sekundären Gaumens entstehen durch die unvollständige Fusion der Oberkieferfortsätze mit dem Nasenfortsatz oder der Gaumenfortsätze in der 5. – 12. Embryonalwoche. Spalten können aber auch sekundär nach bereits statt gefundener Fusion durch Einreißen der Epithelnaht entstehen.

Die Lippen-, Kiefer- und Gaumenentwicklung findet von der 5. bis zur 12. Embryonalwoche statt. Ende der vierten Woche wandern Zellen aus der Neuralleiste in die zukünftige Kopf- und Nackenregion ein. Gleichzeitig entstehen auf jeder Kopfseite sechs Kiemenbögen. Aus dem ersten Kiemenbogen (= Maxillarbogen) entwickelt sich der Gaumen. Von entscheidender Bedeutung für die weitere Entwicklung sind der mesenchymale Kern, das den Kiemenbogen überziehende Ektoderm und der Meckel-Knorpel.

Primärer und sekundärer Gaumen entwickeln sich unabhängig. Ende der 5. Woche schiebt der Nasenfortsatz sich zwischen die beiden Oberkieferfortsätze. In der 6./7. Woche verschmelzen die drei Anteile, der primäre Gaumen ist entstanden. Der Nasenfortsatz bildet das Philtrum und den unpaaren Anteil des Gaumens. Das Foramen incisivum stellt die Grenze zwischen primärem und sekundärem Gaumen dar. Fusionieren die drei Anteile nicht, so resultiert eine bilaterale oder eine unilaterale Lippen-Kieferspalte.

Der sekundäre Gaumen entwickelt sich in der 8./9. Woche. Zunächst wachsen die Gaumenfortsätze vertikal an den Seiten der Zunge entlang. Infolge des Längenwachstums des Kopfes, osmotisch bedingtem Anschwellen der Fortsätze sowie Kontraktion der Mesenchymzellen kommt es Ende der 9. Woche zu einer plötzlichen Elevation der Fortsätze in die horizontale Ebene (Ferguson 1988). Beide Fortsätze berühren sich in der Mitte und haften mittels Desmosomen und Glykoproteinen aneinander. Es bildet sich eine Epithelnaht. Diese Epithelnaht degeneriert unter dem Einfluss verschiedener Faktoren. Das Mesenchym kann sich ungehindert über den Gaumen ausbreiten. Die Fusion schreitet von ventral nach dorsal fort. Geschieht die Fusion nur unvollständig, so kommt es zu einer Gaumenspalte.

Die Entwicklung des Gaumens wird von vielen verschiedenen Wachstumsfaktoren, Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Ist die Struktur der Faktoren, die Menge oder das zeitliche Auftreten der Moleküle verändert, könnte das zur Bildung einer LKGS führen.

1.3 Auf der Suche nach den verantwortlichen Genen

Studien zur normalen und pathologischen embryonalen Gesichtsentwicklung bei verschiedenen Arten von Wirbeltieren können auch zur Klärung der Ätiologie der menschlichen LKGS beitragen.

1.3.1 Studien an Tiermodellen

Um die für die Entstehung der LKGS verantwortlichen Gene zu charakterisieren, werden Tiermodelle studiert, deren Phänotyp eine deutliche Ähnlichkeit mit der Fehlbildung beim Menschen zeigt. Es gibt 30 verschiedene Mausstämme mit LKGS-Fehlbildungen. Diese Tiermodelle entstehen spontan oder werden durch Röntgenstrahlung und chemische Mutagenese erzeugt. Das Mausmodell Twirler ist ein Beispiel für eine spontan entstandene Mutation. Die Mutation wurde auf dem Mausechromosom 18 lokalisiert. Homozygote Mäuse zeigen entweder eine LK/GS oder eine GS (Lyon et al. 1958, Lane et al. 1981). Wenn Hinweise für eine mögliche Beteiligung eines Gens an der Entstehung der LKGS bestehen, ist die gezielte Genmanipulation eine weitere Möglichkeit, Tiermodelle zur Klärung der Ätiologie der LKGS zu erzeugen. Dabei wird ein Gen in Maus-ES-Zellen gezielt verändert oder ausgeschaltet (transgene, knockout und knockin Mutanten). Anschließend werden die genetisch manipulierten Mäuse miteinander gekreuzt und die Nachkommen auf den veränderten Phänotyp und Genotyp untersucht. Als Modell für GS eignen sich Mäuse, deren Gene *Tgfb3*, *Mx1* und *Egfr* ausgeschaltet sind (Proetzel et al. 1995, Satokata 1994, Miettinen et al. 1999). Für LK/GS existiert bisher kein geeignetes Tiermodell.

1.3.2 Expressionsstudien an Gewebekulturen

Zur Klärung der normalen embryonalen Entwicklung der Lippe, des Kiefers und des Gaumens tragen Expressionsstudien an in vitro Gewebekulturen von Mäusen, Hühnern und Alligatoren bei. Ändert sich das Expressionsmuster eines Gens zum Zeitpunkt der Lippen-, Kiefer- oder Gaumenfusion, wird es als Kandidatengen in Betracht gezogen. Zu beachten ist, dass Hühner und Alligatoren physiologischer Weise einen gespaltenen Gaumen aufweisen.

Auch die Entwicklung von knockout Mutanten kann mit Hilfe von Gewebekulturen verfolgt und die Bedeutung des ausgeschalteten Gens studiert werden. Weitere Vorteile, die Studien an Gewebekulturen bieten, sind die direkte Beobachtung der Auswirkungen

zum einen durch Aktivitätshemmung der Kandidatengene mit Antisense-Oligonukleotiden oder Antikörpern sowie zum anderen durch Zugabe der Expressionsprodukte der Kandidatengene zu normalen und knockout Gewebekulturen.

1.3.3 Die Kandidatengene

Die komplizierte Entwicklung des Gaumens bei der Maus wird unter anderem durch die Proteine Tgfa, Tgfβ3 und Egfr vermittelt. Diese Wachstumsfaktoren werden zeitlich und lokal reguliert (Dixon 1991; Fitzpatrick et al. 1990).

1.3.3.1 Die Gene Tgfa und Egfr

Transforming Growth Factor alpha (Wachstumsfaktor alpha, TGFα) ist ein Wachstumsfaktor, dessen kodierende Sequenz beim Menschen auf Chromosom 2p13 liegt. Es handelt sich um ein aus 160 Aminosäuren bestehendes integrales Glykoprotein mit einer extrazellulären Region. Diese extrazelluläre Region kann durch ein elastaseähnliches Protein abgespalten werden. Das Spaltprodukt ist 50 Aminosäuren groß und besitzt drei von Disulfidbrücken gebildete Schleifen (Marquardt et al. 1982). Über diese Schleifen bindet Tgfa an den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (Epidermal Growth Factor Receptor, Egfr). Das aus drei Schleifen bestehende strukturelle Motiv wird auch bei anderen Wachstumsfaktoren (z.B. Epidermal Growth Factor, EGF) beobachtet, die an Egfr binden (Carpenter & Cohen 1979).

Bei der Maus kann Tgfa in verschiedenen Geweben Zellmigration, Angiogenese und Wundheilung induzieren sowie Zelldifferenzierung kontrollieren (Barandon & Green 1987; Schreiber et al. 1986; Schultz et al. 1987; Luetke et al. 1993). In der Gaumenentwicklung reguliert Tgfa das Wachstum der Gaumenfortsätze durch Proliferation des Mesenchyms. Außerdem verhindert Tgfa die Apoptose des Mittellinienepithels. Die Konzentration von Tgfa und Egfr steigt kurz vor der Elevation und der Fusion der Gaumenfortsätze sowohl im Mittellinienepithel als auch im darunter liegenden Mesenchym an. Vor allem in den Bereichen, in denen die Fortsätze aneinander haften, können Tgfa und Egfr verstärkt nachgewiesen werden. Nach der Fusion bleibt die Konzentration im Mesenchym gleich, ist aber in den Resten der Epithelnaht nach wie vor erhöht (Dixon 1991).

Tgfa-knockout Mäuse (waved-1) entwickeln keine LKGS (Luettke et al. 1993). *Egfr*-knockout Mäuse weisen eine GS mit inkompletter Penetranz auf (Miettinen et al. 1999). Aus diesem Grund wird angenommen, dass *Tgfa* einen modulierenden Einfluss auf die Gaumenentwicklung ausübt (Murray et al. 1995).

Aufgrund der oben beschriebenen Bedeutung der Wachstumsfaktoren *Tgfa* und *Egfr* bei der Gaumenentwicklung der Maus untersuchten Ardinger und Mitarbeiter (1989) die homologen Gene beim Menschen auf Sequenzvarianten. Diese Arbeitsgruppe konnte zwei Polymorphismen bei LK/GS Patienten in *TGFα* beschreiben. Es handelt sich um eine 4 bp Deletion in Intron 5 und eine nicht näher beschriebene Mutation, durch die eine BamHI-Schnittstelle entsteht. Beide Sequenzvarianten konnten mit LK/GS assoziiert werden. Weitere Fall-Kontroll-Assoziationsstudien konnten diese Assoziation für die US-amerikanische und die britische Population bestätigen bzw. ausschließen (Feng et al. 1994; Holder et al. 1992; Lidral et al. 1998; Hecht et al. 1991).

Fünf Sequenzvarianten werden für *EGFR* beschrieben. Es handelt sich um Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs), die nicht mit menschlicher LKGS in Fall-Kontroll-Assoziationsstudien assoziiert werden konnten (Ardinger et al. 1989).

1.3.3.2 Das Gen *Tgfβ3*

Bei Säugern sind drei Mitglieder der Transforming Growth Factor beta Genfamilie bekannt (*Tgfβ1*, *Tgfβ2* und *Tgfβ3*). Es handelt sich um hoch konservierte Isoformen mit unterschiedlichen Aufgaben und Expressionsmustern. Die für *TGFβ3* kodierende Gensequenz liegt beim Menschen auf Chromosom 14q24.

Bei der Maus ist *Tgfβ3* bei der Herzentwicklung, der Wundheilung und während der Gaumenentwicklung von Bedeutung. Im Mittellinienepithel wird es zur Zeit der Fusion der beiden Gaumenfortsätze exprimiert (Fitzpatrick et al. 1990; Pelton et al. 1990). Durch Induktion der Apoptose des Mittellinienepithels wird die Fusion der Gaumenfortsätze begünstigt.

Gaumenfortsätze von *Tgfβ3*-knockout Mäusen fusionieren in Gewebekulturen nicht. Gibt man zum Zeitpunkt der Gaumenfusion (14. Entwicklungstag) rekombinantes humanes TGFβ3 zu diesen Kulturen, findet die Fusion bei der Mehrzahl der

Gaumenfortsätze statt. Auch Hühnergaumen, die physiologischer Weise nicht fusionieren, verschmelzen unter Zugabe von rekombinantem humanem TGF β 3 (Sun et al. 1998). In Gewebekulturen von normalen Mäusen beschleunigt rekombinantes humanes TGF β 3 die Fusion (Taya et al. 1999). Diese Studien weisen auf die Bedeutung von Tgf β 3 bei der Gaumenentwicklung von Maus und Huhn hin.

Aufgrund der oben beschriebenen Bedeutung von Tgf β 3 bei der Gaumenentwicklung von Maus und Huhn, untersuchten zwei Studien das zu *Tgf β 3* homologe Gen beim Menschen auf Sequenzvarianten (Lidral et al. 1997, 1998). Bei den beobachteten Sequenzvarianten handelt es sich um eine 6 bp Deletion im Promotorbereich und einen Basenaustausch C \rightarrow T in Intron 4 von *TGF β 3*. Beide Sequenzvarianten konnten im Transmissions Disequilibrium-Test (TDT) mit LK/GS assoziiert werden (Lidral et al. 1998). Hingegen konnte eine Assoziation dieser Sequenzvarianten mit GS in Fall-Kontroll-Assoziationsstudien bisher nicht nachgewiesen werden (Lidral et al. 1998).

1.4 Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Die Ätiologie der nicht syndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) ist weitgehend unbekannt. Eine Beteiligung genetischer und umweltbedingter Faktoren wird diskutiert.

Expressionsstudien von Kandidatengenen an Gaumengeweben der Maus sowie Studien an Tiermodellen, deren Phänotyp Ähnlichkeit mit der humanen Lippen-Kiefer-Gaumenspalte aufweist, sind für die Ursachenforschung der menschlichen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten von Bedeutung. Solche Expressionsstudien weisen auf eine Beteiligung der Wachstumsfaktoren Tgf α und Tgf β 3 bei Mäusen und Hühnern hin.

In Assoziationsstudien ist der TGF α -Locus mit LK/GS und/oder GS in der französischen, britischen und nordamerikanischen Bevölkerung assoziiert. Der TGF β 3-Locus ist in der nordamerikanischen Bevölkerung mit LK/GS assoziiert. Für die deutsche Population wurden bisher keine Assoziationsanalysen für TGF α und TGF β 3 durchgeführt. Da die genetischen Ursachen der LKGS populationspezifisch sein können, soll die vorliegende Studie untersuchen, ob TGF α und TGF β 3 in der deutschen Population an der Ätiologie der LK/GS und/oder GS beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Grundchemikalien für Puffer und Lösungen wurden in p.A.-Qualität bezogen.

Acrylamid (30 %)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid (2 %)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll (Typ 400)	Sigma Chemical Company, UK
Formaldehyd (mind. 37 %)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycerin (ca. 87 %)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HPLC-H ₂ O	Merck, Darmstadt
Ionenaustauscher	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Riedel-de-Haën, Seelze
Isopropanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Long Ranger Gel Solution (50 %)	FMC, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MDE-Gel-Solution	
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Mallinckrodt Baker B.V., NL

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure (mind. 37 %)	Riedel-de-Haën, Seelze
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Riedel-de-Haën, Seelze
10x TBE-Puffer	Roth, Karlsruhe
Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen ausschließlich von folgenden Firmen: Amersham (USA) Gibco BRL (USA), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (UK).

2.1.2 Enzyme, Fertigpuffer und Nucleinsäuren

DNA-Größenstandard:

100 bp DNA-Marker Gibco BRL, USA

GS 350 TAMARA Perkin Elmer Cetus, USA

DNA Sequencing Kit Applied Biosystems, USA

Dye Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction

Desoxyribonucleotide

DNA-Polymerisierungsmix (je 20 mM) Pharmacia Biotech, Schweden

Oligonucleotide (Primer) MWG-Biotech, Ebersberg

Applied Biosystems, USA

pBR322-DNA New England BioLabs, USA

PCR-Reagenzien:

MgCl_2 -Puffer (25 mM) Amersham, UK

10 × PCR-Puffer Amersham, UK

Taq-DNA-Polymerase (5 U / μl) Amersham, UK

PCR-Beads

Pronase (100 µg / µl)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen
Puffer PB	
Puffer PE	
Puffer EB	
Restriktionsendonuclease <i>MspI</i>	Boehringer, Mannheim
10 × Restriktionspuffer L	Boehringer, Mannheim
RNAse A	Boehringer, Mannheim

Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Puffer und Kit-Bestandteile ist nur dem Hersteller bekannt.

2.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer werden mit entmineralisiertem Wasser angesetzt. Der pH-Wert wird mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

Gelladepuffer:

Agarosegelladepuffer	15 % Ficoll und 0,05 % Xylencyanol oder 0,05 % Bromphenolblau oder 0,05 % Bromphenolblau und 0,05 % Xylencyanol
SSCA-Gelladepuffer	95 % Formamid 20 mM EDTA (pH 7,4) 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
PAA-Gelladepuffer	30 % Glycerol 20 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol

RCLB	10 mM Tris · HCl 10 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ , pH 7,6 autoklavieren
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM EDTA, pH 8,0 autoklavieren
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
5 × TBE-Puffer	10 mM EDTA 0,5 M Tris · Borat, pH 8,0
1 × TE-Puffer	10 mM Tris · HCl 1 mM EDTA, pH 7,6 autoklavieren

2.1.4 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
DNA-Sequencer, Modell 373A mit Softwarepaket Sequencer	Applied Biosystems, USA Gene Codes, Ann Arbor
Gelelektrophorese-Kassette (INGENYphorU-2x2) mit Puffertank (INGENYphorU) und Zubehör	INGENY, Leiden, Niederlande
Gelelektrophoresekammern horizontal Modelle H4 und H5	Gibco BRL, USA
Gelelektrophoreseschlitten	Medizintechnik, Marburg
Gelkämme	Gibco BRL, USA Medizintechnik, Marburg
Hoefer SE600 Elektrophorese Einheit	Amersham, Freiburg
Kühlzentrifuge Sorvall RT 6000 B	DuPont, USA
Magnetrührer Ikamag RO und RH	Ika-Werk, Staufen
pH-Meter	Wiss.-techn. Werkstätten, Weilheim
Photometer UV-160	Shimadzu, Japan

Pipetten

Eppendorf-Pipetten	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Finnpipetten	Labsystems, Finnland
Multipette	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
12-Kanal-Pipette	Dunn Labortechnik
Microliter Syringe	Hamilton, Schweiz

Pipettenspitzen

Micro-Bio-Tec Brand
Sarstedt, Nümbrecht

Pipettierhilfe Automatic Sarpette

Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße:

Falcon Tubes, (50 ml und 14 ml)	Falcon, USA
Micro Test Tubes (0,5 ml und 1,5 ml)	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Strip-Ease-12 PCR Tubes (0,2 ml)	Robbins, USA
Micro Amp Reaction Tubes (0,2 ml)	Perkin Elmer Cetus, USA

SSCA-Kammer PhorU-2

Ingeny, Leiden, NL

Spannungsgeber:

Phero-stab. 300	Biotec-Fischer
PP2-79	MAGV, Rabenau-Londorf
PS 9009TC	Life Technologies

Thermocycler:

GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer Cetus, USA
Trio Thermoblock TB 1	Biometra, Göttingen

Thermostat-Metallblock Techne DB 3

Kobe, Marburg

Tischzentrifugen:

Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Eppendorf Zentrifuge 5415 C	Eppendorf Gerätebau, Hamburg

UV-Transilluminator UVT 2035 (302 nm)

Herolab, Wiesloch

mit Dokumentationssystem E.A.S.Y.

Vortex Reax 2000

Heidolph, Hamburg

Waagen:

Präzisionswaage 2254	Sartorius, Göttingen
Feinwaage AE 240	Mettler, Schweiz

Wasserbäder:

Typ 3042

Köttermann, Hänigsen

Typ 1083

GFL, Burgwedel

Hier nicht aufgeführte Werkzeuge der Laborgrundausrüstung wurden von der Medizintechnik (Universität Marburg) und der Fa. Kobe (Marburg) bezogen.

2.1.5 Software

Textverarbeitung

Word 97, Microsoft

Statistik

StatXact 4, Cytel Software

Literaturverwaltung

EndNote 3.1, Niles Software

Grafik

CorelDraw 8, Eastman Kodak

Photoshop 4.0, Adobe

2.2 Nomenklatur der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (LKGS)

Aufgrund der klinischen Ausprägung und der embryonalen Entwicklung unterscheidet man Spalten des primären und des sekundären Gaumens. Die Bezeichnung der Phänotypen wird in der deutschen Literatur häufig synonym gebraucht. In dieser Arbeit wird die Nomenklatur dem angloamerikanischen Schrifttum angeglichen. Fehlbildungen des primären Gaumens werden als Spalten der Lippe und/oder des Kiefers bezeichnet. Zusätzlich kann der sekundäre Gaumen betroffen sein (LK/GS): Cleft Lip with or without Cleft Palate (CL/P, OMIM 119 530). Ist die Fehlbildung ausschließlich auf den sekundären Gaumen beschränkt, handelt es sich um eine Gaumenspalte (GS): Cleft Palate Only (CPO, OMIM 119 540). Der Begriff Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (LKGS) wird in dieser Arbeit nur verwendet, wenn sowohl LK/GS als auch GS gemeint sind.

2.3 Probanden

2.3.1 Patienten

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Philipps-Universität Marburg (Prof. Dr. Dr. K.-H. Austermann, Prof. Dr. Dr. Hochban) wurden die Blutproben der Patienten und deren Eltern im Rahmen der LKGS-Sprechstunde und bei Säuglingen im Rahmen der Operationsvorbereitung entnommen. Mütter und Väter der Patienten wurden mittels eines Fragebogens nach Krankheiten, Medikamenten, Rauchgewohnheiten und Alkoholkonsum in der Schwangerschaft sowie weiteren Fällen von LKGS in der Verwandtschaft befragt.

Die Studie wurde 1998 der Ethikkommission der Universität Marburg vorgelegt und die Durchführung ohne Einwände genehmigt.

Insgesamt wurden für diese Arbeit DNA-Proben von 37 Familien mit LK/GS und 10 Familien mit GS untersucht. Patienten mit einer syndromalen LKGS wurden von dieser Studie ausgeschlossen. Die Familien wurden in Familien mit LK/GS und Familien mit GS untergliedert (Tabelle 2.1 und 2.2). Von den untersuchten Patienten waren 33 männlich und 14 weiblich. In den Familien mit LK/GS waren 12 weitere Familienmitglieder betroffen (Tab. 2.1). Die Phänotypenbeschreibung erfolgte nach dem Thallwitzer Modell.

Entsprechend dem Thallwitzer Modell beginnt man bei der Beschreibung einer Spalte stets mit der rechten Seite in folgender Reihenfolge: Lippe, Kiefer, Gaumen, Segel. Die linke Seite schließt sich an, wobei man jedoch zunächst den Gaumen, dann den Kiefer und zum Schluß die Lippe beschreibt. Die Ziffern 0 - 3 zeigen die Stärke der Ausprägung:

$L_0K_0G_0S_0G_0K_0L_1$ wäre somit eine minimale Lippenspalte auf der linken Seite.

Bei 10 der 37 LK/GS-Familien wurde eine familiäre Häufung an LK/GS beobachtet. Betroffen waren zusätzlich zu den Patienten 12 Familienmitglieder (Tab. 2.1). Blutsverwandtschaften zwischen den Eltern der LK/GS-Patienten waren nicht bekannt. Bei den GS-Familien waren keine weiteren Familienmitglieder von einer GS betroffen. Blutsverwandtschaften zwischen den Eltern der GS-Patienten waren in keinem Fall bekannt. Als Besonderheit ist das Auftreten einer LK/GS bei einem Cousin eines GS-Patienten zu nennen.

Die Einteilung der Familien erfolgt nach Verfügbarkeit der DNA-Proben.

Tabelle 2.1 Aufschlüsselung der LK/GS-Familien

Familien	n = 37	Weitere LK/GS – Fälle bei				
		Geschwister	Mutter	Vater	Großmutter	Sonstigen Verwandten
Drei-Generationenfamilien	4	-	2	-	1	-
Zwei-Generationenfamilien:						
mit 1 Kind	16	-	1	1	-	-
mit 2 Kindern	11	2	-	-	-	2
mit 3 Kindern	2	2	-	1	-	-
unvollständige Familien:						
Mutter mit 1 Kind	4	-	-	-	-	-

Tabelle 2.2 Aufschlüsselung der GS-Familien.

Familien	n = 10	Weitere GS – Fälle bei				
		Geschwister	Mutter	Vater	Großmutter	Sonstigen Verwandten
Drei-Generationenfamilien	1					
Zwei-Generationenfamilien:						
mit 1 Kind	6					1 (LK/GS)
mit 2 Kindern	2					
mit 4 Kindern	1					

2.3.2 Kontrollen

Als Kontrollen dienten insgesamt 185 anonym gespendete DNA-Proben aus der deutschen Population mit einem Altersspektrum von 20 – 60 Jahren. Dabei handelte es sich um 71 von Männern und 114 von Frauen stammende DNA-Proben. Die Überzahl der weiblichen DNA-Proben erklärt sich aus der Tatsache, dass diese im Rahmen verschiedener Studentenpraktika im Institut für Humangenetik gesammelt wurden, an denen hauptsächlich weibliche Personen teilnahmen. Bei der überwiegenden Anzahl dieser Personen konnte das Auftreten von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in der Verwandtschaft ersten bis dritten Grades ausgeschlossen werden.

2.4 Experimentelle Methoden

2.4.1 DNA-Isolation aus peripheren Blutleukozyten

Zur Isolation werden ca. 10 ml Blut eingesetzt. Die Gerinnung wird durch den Zusatz von EDTA verhindert. Mit Red Cell Lysis Buffer (RCLB) füllt man auf 30 ml auf und inkubiert die Lösung 10 Minuten auf Eis. Während dieser Zeit durchmischt man diese Lösung einige Male. Durch die anschließende Zentrifugation (3000 rpm, 4°C, 10 min) sedimentieren die nicht lysierten Leukozyten. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet mit 5 ml RCLB-Puffer gewaschen und anschließend mit RCLB auf 25 ml aufgefüllt, durchmischt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Den Überstand aus Erythrozytentrümmern und lysierten Leukozyten verwirft man. Das Sediment wird mit 5 ml SE-Puffer, 250 µl 10% SDS und 2,5 µl 100 mg/ml Pronase K resuspendiert. Die Leukozyten werden in einem Wasserbad bei 55°C unter konstantem Schwenken für drei Stunden vollständig lysiert. Die vollständige Lyse wird durch Zugabe von 5 ml SE-Puffer und anschließender fünfminütiger Inkubation bei 55°C unterstützt. Die durch die Zellyse freigesetzten und durch die Pronase K zerstörten Proteine werden durch die Zugabe von 2 ml 5 M NaCl-Lösung und vorsichtigem Vortexen bei 1400 rpm gefällt. Die Zentrifugation (3000 rpm, RT, 10 min) bewirkt die Sedimentation der ausgefallenen Bestandteile. Der Überstand wird in ein neues Gefäß gegeben. Die Zugabe von 40 ml 96%igem Ethanol (-20°C) bewirkt die Fällung der DNA. Die DNA wird mit Hilfe eines Glashakens dem Gefäß entnommen, in 70%igem Ethanol gewaschen und danach in TE-Puffer (100 – 600 µl, abhängig von der DNA-Menge) über Nacht bei 4°C gelöst. Die Konzentration wird photometrisch ermittelt. Ist die DNA nicht sichtbar, so wird sie gefällt, indem man bei 3000 rpm, RT, 10 Minuten zentrifugiert und den Überstand verwirft. Der Waschschrift erfolgt mit 500 µl 70%igen Ethanol. Die DNA sedimentiert bei 3000 rpm, RT, 10 min. Der Überstand wird verworfen und die DNA in 50 – 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

2.4.2 DNA-Reinigung

Ist die aus Blut extrahierte DNA durch Proteine verunreinigt, muss sie von RNA und Proteinen (Verdau mit RNase A und Proteinase K) gereinigt und anschließend mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol und Fällung der DNA mit Ethanol aufgereinigt werden.

Nach Zugabe 1/10 Volumens 20 x SSC und 50 µg/ml RNase A wird die zu reinigende DNA eine Stunde lang bei 37°C verdaut. Für den folgenden Proteinverdau wird 1/100 Volumen 10% SDS und 10 µg/ml Proteinase K zugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird mit dem 2fachen Volumen Phenol versetzt und nach gründlichem Mischen 15 Minuten zentrifugiert. Nach Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues Gefäß wird ein 2faches Volumen einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und nach vorsichtigem Schütteln 15 Minuten zentrifugiert. Die DNA in der oberen Phase wird durch Zugabe von ½ Volumen Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol gefällt, zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes schließlich in TE-Puffer gelöst.

2.4.3 DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der DNA wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge und bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht eine Absorption von 1,0 einer DNA-Doppelstrangkonzentration von 50 µg/ml (Sambrock et al. 1989). Zur Konzentrationsmessung wird die DNA-Probe 1 : 50 mit H₂O verdünnt und gegen einen Leerwert (H₂O) als Differenzabsorption gemessen. Zunächst wird das Photometer mit einer Probe H₂O geeicht und die Absorption dieser Probe bei 280 nm gemessen, um Störfaktoren auszuschließen (Kontamination mit DNA). Liegt der Quotient aus Absorption bei 260 nm : Absorption bei 280 nm > 2.0, so läßt dies auf eine Verunreinigung mit RNA-Rückständen schließen. Stark verunreinigte Proben werden mittels RNase-Verdau und anschließender Phenol-Chloroform-Fällung gereinigt.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, mit deren Hilfe man selektiv Abschnitte der DNA in vitro vermehren kann. Dabei werden synthetische Oligonukleotide als Primer verwendet. Primer bestehen aus 15 – 30 Nukleotiden, die komplementär zu einer DNA-Sequenz, welche den zu synthetisierenden DNA-Abschnitt einschließt, sind. Durch Temperaturerhöhung auf 94°C werden die DNA-Stränge getrennt, Vorwärts- und Rückwärtsprimer können sich als Amplimer an die komplementären Abschnitte bei Abkühlung auf die Hybridisierungstemperatur von ca. 55°C anlagern und die hitzestabile Taq-Polymerase - aus *Thermophilus aquaticus* - synthetisiert den zur DNA komplementären Strang bei 72°C. Der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung, Elongation wird mehrere Male wiederholt. Ab dem 3. Schritt entspricht die Länge des synthetisierten DNA-Abschnitts dem Abstand zwischen den Primern und verläuft von nun an exponentiell zur Zykluszahl. Zum Gelingen der PCR müssen DNA, Taq-Polymerase, Desoxyribonukleotidphosphate und ein geeigneter Puffer in einem bestimmten Verhältnis vorliegen. Die optimalen PCR-Bedingungen werden für jedes Primerpaar empirisch ermittelt. Dabei werden alle Ansätze auf Eis pipettiert, um einen vorzeitigen Start der Reaktion zu vermeiden.

Die als Matrizie dienende DNA wird vorgelegt. Die übrigen Reaktionssubstanzen werden in einem Ansatz gemischt und anschließend auf die Proben verteilt. Als Negativkontrolle dient ein sogenannter Leerwert (Ansatz ohne DNA), der zum Ausschluß von DNA-Kontamination mitgeführt wird. Die PCR erfolgt auf programmierbaren Thermocyclern mit beheizbaren Deckeln.

Tabelle 2.3 Standard-PCR-Programm

	Temperatur (°C)	
Denaturierung	94	5 min
	94	30 sec
Hybridisierung	50-60	30 sec
Elongation	72	30 sec
finale Synthese	72	5 min
Stop	4	∞

2.5.1 PCR-Optimierung

Von entscheidender Bedeutung ist die Wahl der Primer. Die Länge der Primer sollte 15 – 30 bp (Strachan & Read, 1996) betragen. Die Spezifität zum komplementären Matrizenstrang steigt mit Zunahme der Primerlänge. Der G/C-Gehalt des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers sollten etwa gleich groß sein, da sich die Hybridisierungstemperatur an diesem orientiert und bei beiden Primern ähnlich sein sollte. Grundsätzlich gilt, dass mit einer höheren Hybridisierungstemperatur die Spezifität der Primer steigt und unspezifische Produkte vermieden werden können. Weiterhin kann zur Optimierung der PCR-Bedingungen die Pufferzusammensetzung variiert werden. So begünstigt eine zu hohe Konzentration an Magnesiumchlorid die Entstehung unspezifischer Produkte, eine zu niedrige Konzentration verringert die Produktausbeute. Zur Optimierung werden neben dem PCR-Standardpuffer in dieser Arbeit auch Zusätze von Formamid 2,5 – 10%ig, DMSO 2,5 – 10%ig, ein aus 12 verschiedenen Puffern bestehender PCR-Optimierungskit (für einen PCR-Ansatz von 12,5 µl), dessen Zusammensetzung in pH-Wert (8,3 – 9,2), Magnesiumchloridkonzentration (1,5 – 3,5 mM) und Kaliumkonzentration (25 – 75 mM) variiert, sowie PCR Beads (für einen PCR-Ansatz von 25 µl) eingesetzt. Ebenfalls von entscheidender Bedeutung ist die Wahl der Dauer der Elongationszeit (10^3 bp/ min).

Die optimalen Bedingungen für die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in den Tabellen 2.3 und 2.4 aufgeführt. Das Ergebnis jeder PCR wird auf einem 2%igen Agarosegel überprüft. Die PCR-Produkte können bei –20°C aufbewahrt werden.

Tabelle 2.4 PCR-Zyklusbedingungen für die verwendeten Primer

Genlocus	Primerpaare	Zyklen						Anzahl
		Denaturierung		Hybridisierung		Elongation		
		[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	
TGFα	In5 f + r	94	30	56	30	72	30	35
	D2S443 f + r	94	30	57	30	72	30	35
TGFβ3	5'UTR.1 f + r	94	30	58	30	72	30	35
	X5.1 f + r	94	30	58	30	72	30	35

2.5.2 PCR zur Genotypisierung des *TGF α* -Locus

TGF α liegt auf Chromosom 2p13. Die Lokalisation, die Sequenz sowie die Hybridisierungstemperatur der Primer und die Fragmentgröße sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5 Primer für den Locus *TGF α*

Primer Name	Primer-lokalisierung ¹	Sequenz-variante	Primer Sequenz	Fragment-größe	Allel-anzahl	Hybridisierung [°C]
In5 ²	445 bis 466 In5	Δ 4bp	<i>GAA TTT GGC CTA TGA AAA GGT CT</i>	117 bp	2	56
In5 ²	541 bis 562 In5		<i>ACA TCC TGA TGT CTT CAT GGA T</i>	113/ Δ 4bp		
D2S443f ³	⁴	D2S443	<i>GAG AGG GCA AGA CTT GGA AG</i>	251 bp	12	57
D2S443r	⁴		<i>ATG GAA GAG CGT TCT AAA ACA</i>			

¹ Die Beschreibung der Primerlokalisierung erfolgt nach der Nukleotidsequenz in NCBI Acc. X70341

² In der Literatur wird dieser Primer nach der Erstbeschreibung des Polymorphismus von Ardinger und Mitarbeitern (1989) mit *TGF α* /TaqI bezeichnet, da durch die 4 bp-Deletion eine Schnittstelle für das Enzym TaqI entsteht.

³ Dieser Primer wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff FAM markiert.

⁴ Die genaue Lokalisation der Primer kann nicht angegeben werden, da sich diese Mikrosatellitenregion nicht in *TGF α* befindet und in der Literatur keine näheren Angaben gemacht werden.

2.5.2.1 PCR zur Genotypisierung der 4 bp Deletion in Intron 5 des *TGF α* -Gens

Die von den In5-Primern flankierte Zielsequenz liegt in Intron 5 des Transforming Growth Factor alpha Gens (*TGF α*). Die Produktgröße des Wildtypfragments beträgt 117 bp, die des deletierten Fragments 113 bp. Das Wildtypallel wird in der vorliegenden Arbeit mit wt, die Sequenzvariante mit Δ 4bp bezeichnet. Die Häufigkeit der 4 bp Deletion liegt in der kaukasischen Bevölkerung Iowas/USA bei 6% (Basart et al. 1994). Die Deletion kann nach PCR-Amplifikation und anschließender Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 8%igen nicht denaturierendem Polyacrylamidgel und Färbung mit Ethidiumbromid direkt nachgewiesen werden.

Tabelle 2.6 Reaktionsansatz für die PCR mit In5 -Primern

10xPCR-Puffer	5,0 µl
dNTPs (20 mM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (1:50)	1,0 µl
In5 f (20 pmol/µl)	0,5 µl
In5 r (20 pmol/µl)	0,5 µl
DNA (50 ng/µl)	2,0 µl
H ₂ O (HPLC-Wasser)	ad 50 µl

2.5.2.2 PCR zur Genotypisierung der Mikrosatellitenregion D2S443

Die D2S443-Primer flankieren eine Mikrosatellitenregion in der unmittelbaren Nähe von *TGF α* auf Chromosom 2p. Diese Region setzt sich aus wenigen repetitiven Basenquartetts (AAGG) zusammen. Die verschiedenen Allele unterscheiden sich in ihrer Größe durch die Anzahl der Wiederholungen. Insgesamt können 12 Allele nachgewiesen werden. Die Allele 5-7 kommen mit einer Häufigkeit von 72,4% in kaukasischen Familien vor (USA, Wyszynski et al. 1997).

Der Nachweis gelingt durch PCR-Amplifikation. Der Polymorphismus wird mit D2S443 bezeichnet. Nach Kontrolle der Produktlänge der PCR-Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel erfolgt die genaue Längenbestimmung mit der automatischen DNA-Fragmentlängenanalyse.

Tabelle 2.7 Reaktionsansätze für die PCR mit D2S443-Primern

10xPCR-Puffer	5,0 µl
dNTPs (20mM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (1:50)	1,0 µl
D2S443 f (20 pmol/µl)	0,5 µl
D2S443 r (20 pmol/µl)	0,5 µl
DNA (50 ng/µl)	2,0 µl
H ₂ O (HPLC-Wasser)	ad 50 µl

2.5.3 Genotypisierung im TGF β 3-Gen

TGF β liegt auf Chromosom 14q24. Informationen zu den Primern und die Fragmentgröße der Amplifikationsprodukte können Tabelle 2.8 entnommen werden.

Tabelle 2.8 Primer für *TGF β 3*

Primer Name	Primer Lokalisation ¹	Sequenz-variante	Primer Sequenz	Fragment-größe	Allel-anzahl	Hybridisierung [°C]
5'UTR.1f	2063 bis 2084	Δ 6bp ²	<i>GGC TTT TCC TGT GCC TGT TTA A</i>	254 bp	2	58
5'UTR.1r	2296 bis 2316		<i>CGC TCA TTC CCT TGG ACT TGA</i>	254/ Δ 6bp		
X5.1f	25 bis 39 (Intron 4)	68C→T ³	<i>TGA TGG GCG TGT GGA G</i>	193 bp	2	58
X5.1r	203 bis 217 (Exon 5)		<i>GTC GAG CCG GTG TGG</i>			

¹Die Beschreibung der Primerlokalisierung erfolgt nach den Nukleotidsequenzen in NCBI Acc. M60556 und X14889.

²Die 6 bp Deletion liegt an Stelle 2250 der Nukleotidsequenz Acc. M60556.

³Der Basenaustausch C→T liegt an der Stelle 68 der Nukleotidsequenz Acc. X14889.

2.5.3.1 PCR zur Genotypisierung der 6 bp Deletion im Promotorbereich des TGF β 3-Gens

Die 5'UTR.1-Primer schließen eine 254 bp Region im Promotorbereich von *TGF β 3* ein. Dieser Abschnitt setzt sich aus jeweils 6 bp-Wiederholungen (AGAGGG) zusammen. Eine dieser Wiederholungen kann deletiert sein (Δ 6bp). Diese Sequenzvariante kommt mit einer Frequenz von 6% in der kaukasischen Bevölkerung Iowas/USA vor (Lidral et al. 1998).

Die Sequenzvariante wird in der vorliegenden Arbeit mit Δ 6bp und das nicht deletierte Allel wird mit wt bezeichnet. Nach PCR-Amplifikation und anschließender Kontrolle der Fragmentgröße auf einem 2%igen Agarosegel erfolgt die Auftrennung der PCR-Fragmente auf einem 8%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid.

Tabelle 2.9 Reaktionsansätze für die PCR mit 5'UTR-Primern

10xPCR-Puffer	5,0 µl
dNTPs (20mM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (1:50)	0,5 µl
5'UTR.1 f (20 pmol/µl)	0,5 µl
5'UTR.1 r (20 pmol/µl)	0,5 µl
DNA (50 ng/µl)	2,0 µl
H ₂ O (HPLC-Wasser)	ad 50 µl

2.5.3.2 PCR zur Genotypisierung des Basenaustausches C→T in Intron 4 des TGFβ3-Gens

Die X5.1-Primer flankieren eine Sequenzvariante, die durch einen Basenaustausch von C→T verursacht wird und in Intron 4 von *TGFβ3* liegt. Der Basenaustausch kommt mit einer Frequenz von 6% in der kaukasischen Population Iowas/USA vor (Lidral et al. 1998). Der Polymorphismus wird in der vorliegenden Arbeit mit 68C→T bezeichnet (Acc. X14889).

Nach PCR-Amplifikation und Kontrolle der Fragmentgröße von 193 bp auf einem 2%igem Agarosegel wird diese Sequenzvariante mit Einzelstrang-Konformationsanalyse (Single Stranded Conformational Analysis, SSCA) nachgewiesen.

Tabelle 2.10 Reaktionsansätze für die PCR mit X5.1- Primern

10xPCR-Puffer	5,0 µl
dNTPs (20mM)	0,5 µl
Taq-Polymerase (1:50)	1,0 µl
X5.1 f (20 pmol/µl)	0,5 µl
X5.1 r (20 pmol/µl)	0,5 µl
DNA (50 ng/µl)	2,0 µl
H ₂ O (HPLC-Wasser)	ad 50 µl

2.6 Herstellung von Längenstandards

Die Längenstandards werden für die Größenüberprüfung der PCR-Amplifikationsprodukte auf einem 2%igen Agarosegel verwendet.

2.6.1 pBR322/*MspI*

58 µl H₂O und 8 µl Puffer L werden in ein Eppendorfgefäß mit 10 µl pBR322-DNA gegeben. Die DNA wird durch 4 µl der Restriktionsendonuklease *MspI* bei Raumtemperatur eine Stunde verdaut. Zur Kontrolle trägt man den gewonnenen Längenstandard neben einem etablierten pBR322/*MspI*-Marker auf ein Agarosegel auf und trennt die Fragmente bei einer Spannung von 100 V. Haben sich die Fragmente vollständig getrennt, so erfolgt die Dokumentation photographisch.

2.6.2 *HindIII* /*EcoRI*

200 µl λ DNA wird mit 158 µl H₂O und 40 µl Core Puffer in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Je 1 µl der Enzyme *EcoRI* und *HindIII* werden hinzu gegeben, welche die λ DNA 3 Stunden bei 37°C verdauen. Die Kontrolle des Markers erfolgt auf einem 0,7%igen Agarosegel bei einer elektrischen Spannung von 100 V. Die Dokumentation erfolgt photographisch.

2.7 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können mit der Agarose- bzw. der Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden, da sie aufgrund ihrer negativen Ladung (Phosphatreste) in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist sowohl von der DNA-Fragmentgröße der Agarose- bzw. Polyacrylamidkonzentration des Gels als auch von der angelegten Spannung abhängig. Die DNA-Fragmente werden mit Ethidiumbromid- oder Silbernitratfärbung sichtbar gemacht.

Ethidiumbromid ist ein planares Kation. Im elektrischen Feld wandert es den DNA-Fragmenten entgegengesetzt und lagert sich zwischen die gestapelten Basen der DNA ein. Durch UV-Licht (302 nm) angeregt, fluoresziert es mit einer Wellenlänge von 560 nm. Auf diese Art kann man die DNA-Fragmente lokalisieren, an Hand eines Größenstandards zuordnen und anschließend photographieren.

2.7.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Erfolgskontrolle von PCRs verwendet man Agarosegele. Agarose ist ein lineares pflanzliches Polysaccharid, das nach Aufkochen geliert und netzähnliche Strukturen ausbildet, durch welche die DNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe während der Elektrophorese wandern.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt auf einem 2%igen Agarosegel, dem 0,05 µl/ml Ethidiumbromid zugesetzt werden. Die Herstellung geschieht wie folgt: Zunächst wiegt man 2 g Agarose ab und gibt sie in einen Erlenmeyerkolben. Nun fügt man 100 ml 0,5 x TBE hinzu und erhitzt die Mischung unter konstantem Schwenken, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Zu dem abgekühlten Gel gibt man 5 µl Ethidiumbromid. Wird das Gel zäher, so gießt man die Lösung in einen vorbereiteten waagrecht stehenden Gelschlitten, in den Kämme zur Aussparung von Probenaschen (15 µl Volumen) eingehängt sind. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es in die mit Laufpuffer (0,5 x TBE) gefüllte Gelkammer eingesetzt.

Die DNA-Proben werden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt. Dieser enthält Ficoll und beschwert die Proben, so dass diese sich gleichmäßig in den Geltaschen verteilen. Außerdem ist diesem Puffer entweder Xylencyanol oder Bromphenolblau bzw. beide Farbstoffe gemeinsam zugesetzt. Diese Farbstoffe erleichtern das Beladen der Geltaschen, wandern ebenfalls zur Anode und ermöglichen eine visuelle Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke. Gleichzeitig mit den Proben wird ein Längenstandard in eine Geltasche (100 bp-, 25 bp-, oder pBR322/*MspI* - Marker) pipettiert.

Die aufgetrennte DNA wird nach der Elektrophorese auf einem UV-Transilluminator (302nm) sichtbar gemacht und photographiert.

2.7.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Nicht denaturierende Polyacrylamidgele (PAA-Gele) eignen sich zum Nachweis kleiner Deletionen, die in einem Agarosegel aufgrund der relativ großen Poren nicht aufspürbar sind. In dieser Arbeit werden nicht denaturierende PAA-Gele zum Nachweis der Polymorphismen $\Delta 4\text{bp}$ in *TGF α* und $\Delta 6\text{bp}$ in *TGF $\beta 3$* verwendet.

Die Glasplatten werden zur Herstellung eines Polyacrylamidgels mit H₂O und anschließend mit 96%igen Ethanol mit Hilfe optischen Papiers gereinigt und

anschließend von drei Spacern (0,85 mm; zwei seitlich, einer unten) auseinander und mit sechs Klammern zusammengehalten.

Zunächst gibt man für ein 8%iges PAA-Gel 17.5 ml H₂O und 6 ml 5 x TBE zusammen. Nun fügt man 6 ml Acrylamid und 300 µl 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und zum Schluß 10,5 µl des zur Stabilisation dienenden TEMEDs hinzu. Das APS liefert die zum Start der Polymerisation notwendigen Radikale. Die Lösung wird gemischt und vorsichtig, aber dennoch zügig, zwischen die Glasplatten gegossen, wobei die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden ist. Zum Schluß wird ein Kamm mit 20 Probestaschen zwischen die Glasplatten geschoben. Das Gel sollte nach Möglichkeit waagrecht an einem hellen Ort polymerisieren. Die Polymerisationszeit beträgt etwa eine Stunde. Ist das Gel vollständig polymerisiert, so entfernt man den unteren Spacer und setzt das Gel in eine mit 0,5 x TBE gefüllte vertikale Gelelektrophoresekammer. Der Kamm wird entfernt, und die mit 5 µl denaturierendem SSCA-Ladepuffer beschwerten Proben in die Taschen pipettiert. Als Längenstandard wird der pBR322/*MspI*-Marker verwendet.

Der Nachweis von $\Delta 4\text{bp}$ in *TGF α* gelingt mit Hilfe der PCR-Amplifikation. 5 µl PCR-Probenmaterial werden mit 5 µl Ladepuffer und 10 µl H₂O versetzt und in die Geltaschen eines 8%igen PAA-Gels pipettiert. Die Allele trennen sich bei einer Spannung von 280 V innerhalb von etwa 2 Stunden. Anschließend werden die seitlichen Spacer und die obere Glasplatte entfernt und das Gel für 7 Minuten in einem Ethidiumbromid-Färbebad (300 ml H₂O vermischt mit 60 µl 1% Ethidiumbromid) gefärbt. Die DNA-Fragmente werden auf einem UV-Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht und photographiert.

Zum Nachweis von $\Delta 6\text{bp}$ im Promotorbereich von *TGF $\beta 3$* wird ein 6%iges PAA-Gel hergestellt. 3 µl des 254 bp großen PCR-Produktes werden mit 5 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Bei 100 V trennen sich die Allele innerhalb von 16 Stunden. Das weitere Vorgehen erfolgt entsprechend dem oben Beschriebenen.

Tabelle 2.11 Polyacrylamidgelzusammensetzung

Bestandteile	6 %	8 %
H ₂ O	20,5 ml	17,5 ml
5 x TBE	6 ml	6 ml
Acrylamid 40%	4,5 ml	6 ml
APS 10 %	300 µl	300 µl
TEMED	10,5 µl	10,5 µl

2.8 Automatische DNA-Fragmentlängenbestimmung

Mit der automatischen DNA-Fragmentlängenanalyse kann die Länge fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte bestimmt werden. Diese Methode eignet sich zum Nachweis von Mikrosatellitenregionen (z.B. bestehend aus Di-, Tri- und Tetranukleotiden), die sich auf nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen nur ungenau auftrennen und zuordnen lassen. Anstelle eines Gels wird bei dem Gerät ABI 310 eine Kapillare für die Elektrophorese eingesetzt. Sehr hohe Spannungen werden zur Trennung der Moleküle nach Ladung und Länge eingesetzt.

Die PCR wird mit einem am 5'-Ende fluoreszenzmarkieren forward-Primer (FAM) durchgeführt. Zur Längenbestimmung wird ein interner Längenstandard, der mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff (350 TAMRA, TET-markiert) versehen ist, in das gleiche Probengefäß eingebracht. Die bekannten Fragmentlängen des Standards werden zur Erzeugung einer Kalibrierungskurve herangezogen. Anhand dieser können Längen unbekannter PCR-Produkte bestimmt werden. Mit Hilfe dieses internen Längenstandards erreicht man durch Ausschluß von Gelinhomogenitäten einen wesentlich höheren Grad der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit von DNA-Längenbestimmungen, da der interne Längenstandard den gleichen elektrophoretischen Bedingungen wie das zu analysierende DNA-Fragment unterliegt. Verschiedene Gele werden so vergleichbar.

In dieser Arbeit wurde der am 5'-Ende mit blauem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) markierte Primer D2S443f mit dem nicht markierten Primer D2S443r für die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Die PCR-Amplifikation erfolgt wie in Kapitel 2.5.2.2 beschrieben. Diese PCR-Produkte werden je nach Produktmenge mit Wasser verdünnt (1:15 bis 1:30), damit die Signale den Meßbereich nicht übersteigen. 1,2 µl dieser Verdünnung werden mit 20 µl Formamid und 0,85 µl internem Längenstandard 350 TAMRA (TET-markiert) versetzt. Nach Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C

wird das Gemisch in 0,5 µl GeneScan-Tubs pipettiert. Die Elektrophorese (Dauer beträgt 20 – 25 min pro Probe) erfolgt ebenso wie die Größenbestimmung automatisch über die angeschlossene Computersoftware wie im Herstellerhandbuch beschrieben.

2.9 Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)

Bei der SSCA (Single Stranded Conformational Analysis) handelt es sich um eine Methode, mit der Punktmutationen, Deletionen, und Insertionen von nur wenigen Basenpaaren, direkt nachgewiesen werden können. Möglich wird dies, weil die denaturierten PCR-Produkte eine Konformation ausbilden, die durch die Primärstruktur bestimmt wird. Diese Einzelstrangkongformation bestimmt die Wandereigenschaften im elektrischen Feld. Änderungen der Primärstruktur, z.B. durch eine Basensubstitution ausgelöst, führen zu einer Konformationsänderung und somit zu einem veränderten Laufverhalten im Gel. Die optimale Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente liegt bei 150 bis 270 bp.

SSCA-Gele werden zur Auftrennung der Allele des Polymorphismus 68C→T verwendet. Als Elektrophoresekammer dienen Hoefer[®]-Kammern.

Zur Herstellung eines 12%igen Polyacrylamidgels mit einem Vernetzungsgrad 1 : 49 werden zunächst zwei Glasplatten und zwei Spacer mit Isopropanol und H₂O mittels optischen Papiers gereinigt und anschließend seitlich durch die Spacer (15 mm) auseinander und mit zwei Klammern zusammen gehalten. Die Glasplatten fixiert man auf der unteren Halterung unter leichtem Druck auf jeder Seite mit einer Schraube. Zunächst werden die in Tabelle 2.12 aufgeführten Substanzen in ein 50 ml Falcon pipettiert.

Tabelle 2.12

H ₂ O	12,9 ml
10xTBE	1,5 ml
Rotiphorese A	11,7 ml
Rotiphorese B	3,6 ml
APS (10%)	210 µl
TEMED	10,5 µl

Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED werden zum Schluß hinzugefügt. Vorsichtig, ohne dass Luftblasen entstehen, wird die Lösung gemischt und mit einer 60 ml Spritze, deren Öffnung zwischen die Glasplatten ragt, zwischen die Glasplatten gegossen. Ein Kamm mit 28 Probestaschen wird nun mit APS abgetupft, damit die Geltaschen besser polymerisieren, und zwischen die Glasplatten geschoben. Die Polymerisationszeit beträgt mindestens drei Stunden. Um zwischenzeitliches Austrocknen zu vermeiden, wird es mit einem feuchten Papiertuch bedeckt. Der Thermostat wird auf die gewünschte Temperatur eingestellt.

Nach drei Stunden wird der Kamm entfernt und die Taschen mit Hilfe einer Spritze mit H₂O gespült, so dass nicht polymerisierte Acrylamidreste heraus gespült werden.

Mit einer Pipette werden die Probestaschen mit 8 µl Ladepuffer beschwerten, denaturierten PCR-Produkten beladen. Zwischen den Pipettierschritten erfolgt eine gründliche Reinigung der Pipette mit H₂O. Als Marker verwendet man einen 100 bp Marker, der zum Schluß in die Probestasche pipettiert wird. Anschließend wird die obere Pufferkammer auf die Glasplatten gesetzt, fixiert und mit 0,5 x TBE befüllt. Die untere Halterung wird entfernt, die Gele in die Hoefer[®]-Kammer eingesetzt, die obere Pufferkammer mit 0,5 x TBE aufgefüllt, die Elektroden angeschlossen und die gewünschte Spannung (250 V) eingestellt.

Zum Nachweis des Basenaustausches in Intron 4 von *TGFβ3* mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion mit X5.1-Primern werden je nach Produktausbeute 4 – 7 µl PCR-Produkt mit 8 µl denaturierendem SSCA-Ladepuffer versehen und 5 Minuten bei 95°C denaturiert, anschließend stellt man die Proben sofort auf Eis, um eine erneute Doppelstrangausbildung zu unterbinden. Die Proben werden in die vorgesehenen Taschen pipettiert. Die Allele trennen sich bei einer Spannung von 250 V und bei 10°C innerhalb von 16 Stunden, wobei die mutierten Allele ein anderes Laufverhalten im Gel zeigen als die Wildtypallele. Anschließend werden die seitlichen Spacer und die obere Glasplatte entfernt. Die Färbung erfolgt mit Silbernitrat.

2.9.1 Silbernitratfärbung von Polyacrylamidgelen

Die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten DNA-Fragmente können mit Silbernitrat angefärbt werden (Budowle et al. 1991). Dabei lagern sich die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an.

Das Polyacrylamidgel wird in eine mit 250 ml 10%igen Ethanol gefüllte Schale gelegt und 5 Minuten unter leichtem Hin- und Herschwenken darin belassen. Die Lösungen

werden nach jedem Waschschrift verworfen. Nun fügt man 1%ige Salpetersäure für 3 Minuten hinzu und spült anschließend zweimal 2 Minuten mit MilliQ-Wasser. Danach gibt man die frisch hergestellte 12 mM Silbernitrat-Lösung für 30 Minuten hinzu, spült zweimal mit MilliQ-Wasser, bis sich die Lösung nicht mehr braun färbt und legt das Gel in eine mit frisch angesetztem Entwickler (0,14 M Natriumcarbonat + 0,0038% Formaldehyd) gefüllte Schale, in der man das Gel so lange belässt, bis die DNA-Fragmente deutlich sichtbar sind. Das im Entwickler enthaltene Formaldehyd reduziert die Silberionen im schwach basischen Milieu. Das Natriumcarbonat dient als Puffer. Durch Zugabe von 10%iger Essigsäure für 2 Minuten wird die Reaktion gestoppt. Anschließend spült man mit MilliQ-Wasser und gibt für mindestens 30 Minuten Konservierungsflüssigkeit (20% Ethanol + 5% Glycerol) hinzu. Das Glycerol verhindert das Zerschneiden des Gels. Zur Aufbewahrung wird das Gel in Einmachfolie eingepackt. Dazu wird zunächst die Einmachfolie in Wasser eingeweicht, gut ausgedrückt auf der Rahmenunterlage glatt gestrichen. Das Gel legt man auf die Folie und bedeckt es mit Konservierungsflüssigkeit sowie einer zweiten in Wasser eingeweichten und gut ausgedrückten Einmachfolie. Die Flüssigkeit wird zu den Seiten hin ausgestrichen, der Geltrocknungsrahmen darauf gelegt und mit Klammern fixiert. Das Gel wird mindestens zwei Tage getrocknet bevor es mit permanenten LUMOCOLOR[®] Stiften beschriftet werden kann.

2.9.2 Analyse der aberranten SSCA-Fragmente

Ist ein aberrantes DNA-Fragment in der SSCA aufgetreten, so muss es anschließend sequenziert werden. Die SSCA zeigt nur an, ob eine Veränderung in der Nukleotidsequenz vorliegt. Anhand des Gels kann nicht auf die Art der Veränderung geschlossen werden.

Die automatische Sequenzierung gereinigter PCR-Produkte erfolgt im ABI 373 Sequenzier-Automaten. Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf einer Variation der Methode nach Sanger: Kettenabbruchverfahren oder enzymatische Sequenzierung (Sanger et al. 1977).

Im Reaktionsgemisch liegt entweder ein Vorwärts- oder Rückwärtsprimer, Desoxyribonukleotide, in viel geringerer Konzentration mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2'-Desoxyribonukleotide und Taq-Polymerase vor. So entstehen während der Sequenzreaktion Einzelstrang-DNA-Fragmente in unterschiedlicher Größe, da die 2'-Desoxyribonukleotide aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe nicht verknüpft

werden können und es somit zu einem Kettenabbruch kommt. Die Population der entstandenen DNA-Fragmente verfügt also über ein übereinstimmendes 5'-Ende und ein variables 3'-Ende, deren Base durch ihren spezifischen Fluoreszenzfarbstoff identifiziert werden kann. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt nach der Fragmentlänge in einem Polyacrylamidgel. Während der Elektrophorese wird ein Laserstrahl konstant auf eine bestimmte Stelle des Gels fokussiert. Die fluoreszierenden Endnukleotide können so in 5' → 3'-Richtung identifiziert werden.

Zur Sequenzierung verwendet man aus SSCA-Gelen gereinigte PCR-Produkte.

2.9.2.1 Isolierung der DNA-Fragmenten aus SSCA-Gelen

Zur allelspezifischen Sequenzanalyse werden aberrante Fragmente und Wildtypfragmente aus dem mit Silbernitrat gefärbten und getrockneten SSCA-Gel ausgestochen. Das SSCA-Gel wird zuvor fotografisch dokumentiert. Über Nacht löst man die DNA in 50 - 100 µl HPLC bei Raumtemperatur. 5 µl der gelösten DNA werden als Matrize für eine Reamplifikation verwendet. Insgesamt werden 100 µl PCR-Produkt hergestellt und anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert.

2.9.2.2 Reamplifikation

Zur Reamplifikation der gelösten DNA werden 5 µl des Eluats in einen PCR-Ansatz von 50 µl Volumen eingesetzt. Nach Kontrolle von 8 µl PCR-Produkt auf einem 2%igen Agarosegel werden zwei Reamplifikationen pro Ansatz zusammengefaßt.

2.9.2.3 Reinigung

Die Reinigung wird mit dem Qiagen PCR Purification Kit durchgeführt. Hierzu werden 100 µl PCR-Produkt mit 500 µl Puffer PB gemischt und auf eine Säule gegeben. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 1400 rpm wird der Durchfluss verworfen. Nun werden 750 µl Puffer PE zum Waschen auf die Säule gegeben und wie zuvor zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wird zum Trocknen erneut zentrifugiert. Anschließend wird die Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und mit 30 µl HPLC-Wasser versetzt, um das gereinigte PCR-Produkt zu eluieren. Nach einminütiger Inkubation wird abschließend zentrifugiert. Zur Kontrolle der Reinigung und Abschätzung der Produktkonzentration werden 5 µl des Eluates auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.9.2.4 Sequenzreaktion

Ist die Aufreinigung erfolgreich verlaufen, beginnt man nun mit der Sequenzreaktion. Diese findet im Dunklen statt, da der Fluoreszenzfarbstoff sehr leicht durch Lichteinstrahlung beschädigt wird. Zur Sequenzreaktion wird der Big Dye® Terminator Mix von Applied Biosystems verwendet. Für jede DNA-Probe setzt man je zwei Sequenzreaktionen an: jeweils eine mit Vorwärts- und eine mit Rückwärts-Primer.

Die in Tabelle 2.13 aufgeführten Substanzen werden in ein PCR-Gefäß pipettiert und das Sequenzierungsprogramm gestartet (Tab. 2.14). Die Sequenzreaktion erfolgt auf Perkin Elmer-Thermocyclern.

Nach der Sequenzreaktion können die Produkte bei -20°C unter Lichtausschluß aufbewahrt werden.

Tabelle 2.13 Reagenzien zur Sequenzierung

DNA	max. 5 µl
Primer (f oder r) 3,2pmol/ml	1 µl
Taq-Mix (Big Dye®)	3 µl
H ₂ O	10 µl

Tabelle 2.14 Sequenzierungsprogramm

96°C	3 min	
96°C	10 sec	} 25 Zyklen
Tm	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	Pause	

2.9.2.5 Fällung

Anschließend wird die DNA gefällt, indem man 10 µl des Sequenzreaktionsansatzes mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 30 µl Ethanol bei -20°C 30 Minuten inkubiert. Diesen Ansatz zentrifugiert man 10 Minuten bei 14000 rpm. Der Überstand wird mit einer Glaspipette mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgezogen und das Pellet mit 200 µl 70%igen Ethanol gewaschen und 7 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgezogen, das Pellet im Dunklen bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach diesem Schritt können die Proben bei -20°C eingefroren und gelagert werden.

2.9.2.6 Elektrophorese der Produkte der Sequenzreaktion

Die Auftrennung der markierten DNA-Fragmente erfolgt auf einem denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel im ABI 373 Sequenzier-Automaten.

Die Glasplatten für das Sequenzgel müssen vor dem Gebrauch sorgfältig gereinigt und getrocknet werden: erst mit einem Detergens (Alconax) und H₂O und anschließend mit Isopropanol. Dann werden die Platten zusammen geklammert.

Das Gel setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Tabelle 2.15

Harnstoff	30 g
H ₂ O	25,3 ml
10 x TBE	6 ml
Long Ranger Gel Solution (50 %)	7,2 ml

Der Harnstoff wird bei 50°C gelöst und die Gellösung über einen 2 µm Faltenfilter filtriert. Nach Zugabe von 500 µl 10% APS und 24 µl TEMED kann das Gel vorsichtig zwischen die Glasplatten gegossen werden. Der Vorkamm wird eingesetzt und fixiert. Das Gel wird zur Polymerisation zwei Stunden lang in horizontaler Lage gelagert.

Nach Einbau des Gels in den Sequenzier-Automaten wird der Sägezahnkamm so eingesetzt, dass die Zähne etwa 1 mm in das Gel hinein ragen. Die Pufferkammern werden mit 1 x TBE gefüllt und der Gelvorlauf bei 37 Watt für eine Stunde gestartet.

Die Proben werden vor dem Auftragen in 4 µl Ladebuffer (5 : 1 deionisiertes Formamid zu 50 mM EDTA) aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gelagert. Es wird zuerst jede zweite Geltasche beladen und nach zehn Minuten Laufzeit die zweite Hälfte. Die Elektrophorese erfolgt 18 Stunden bei 37 Watt.

Die Sequenzanalyse wird mit der DNA Sequenzier Software, Version 2.1.1 (Perkin Elmer, USA) durchgeführt. Zur Auswertung und Bearbeitung wird das Programm Sequenz Navigator, Version 1.0 (Perkin Elmer, USA) verwendet.

2.10 Familienanalyse zur Haplotypisierung der Gene $TGF\alpha$ und $TGF\beta 3$

Die Haplotypisierung aller Probanden für die Polymorphismen des $TGF\alpha$ -Gens $\Delta 4bp$ und D2S443 sowie des $TGF\beta 3$ -Gens $\Delta 6bp$ und $68C \rightarrow T$ wurde mit Hilfe der Stammbaumanalyse durchgeführt.

Die Haplotypisierung einfach heterozygoter Patienten konnte ohne die Information über die elterlichen Allele durchgeführt werden. Zur Ermittlung der Haplotypen doppelt heterozygoter Patienten wurde eine Typisierung der Eltern durchgeführt. Durch die Analyse der Genotypen innerhalb eines Familienstammbaums konnten die Haplotypen ermittelt werden, sofern die Familienmitglieder informativ waren. In Abbildung 2.1 ist die Haplotypisierung durch genetische Familienanalyse an Beispielen dargestellt.

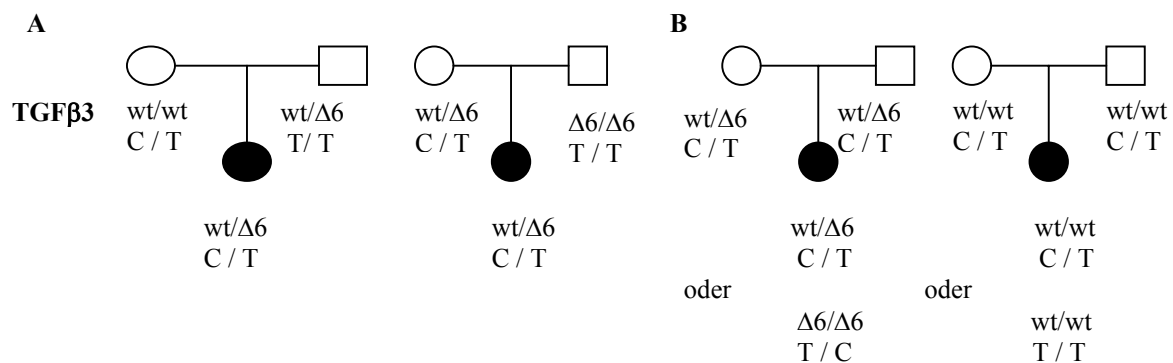


Abb. 2.1 Haplotypisierung durch genetische Analyse der Familienstammbäume im $TGF\beta 3$ -Gen. Das Wildtypallel des untersuchten Polymorphismus in der Promotorregion wird in der Abbildung mit wt, die 6 bp Deletion mit $\Delta 6$ bezeichnet. Der Basenaustausch $C \rightarrow T$ in Intron 4 wird mit dem jeweils vorliegenden Nukleotid bezeichnet.

A: Die dargestellten Familienstammbäume sind informativ. Der Haplotyp wt/C wird von der Mutter, der Haplotyp $\Delta 6/T$ vom Vater vererbt.

B: Die Familienstammbäume sind nicht informativ. Beide Töchter können sowohl die Haplotypen wt/C bzw. $\Delta 6/T$ oder wt/C bzw. wt/T besitzen. Es ist nicht eindeutig bestimmbar, von welchem Elternteil sie welchen Haplotyp geerbt haben.

2.11 Statistische Methoden

Beobachtete Meßwerte werden in der Statistik als eine Stichprobe aus der Grundgesamtheit aller theoretisch möglichen Messungen angesehen. Ein statistischer Test untersucht, ob die Unterschiede zweier Stichproben durch zufallsbedingte Streuung zu erklären sind, die Stichproben also aus derselben Grundgesamtheit stammen. Andernfalls liegt tatsächlich ein Effekt vor und es handelt sich um Stichproben aus zwei verschiedenen Grundgesamtheiten. Dazu werden zwei Hypothesen aufgestellt. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass die beiden verglichenen Grundgesamtheiten hinsichtlich des untersuchten Parameters übereinstimmen. Unter dieser Annahme wäre ein in der Stichprobe beobachteter Effekt ein Produkt des Zufalls. Die Alternativhypothese H_1 besagt, dass der in der Stichprobe gefundene Effekt auch in den Grundgesamtheiten existiert, dass sich also die beiden Grundgesamtheiten hinsichtlich des betrachteten Parameters tatsächlich unterscheiden.

Ein statistischer Test ist ein Entscheidungsverfahren, um zu ermitteln, ob die Nullhypothese H_0 mit den vorliegenden Daten vereinbar ist. Es wird errechnet, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich die vorliegenden Ergebnisse (oder noch extremere) zufällig ergeben könnten, wenn H_0 tatsächlich zuträfe. Wenn diese Wahrscheinlichkeit gering ist (kleiner als das zuvor vereinbarte Signifikanzniveau α), wird H_0 verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Das Signifikanzniveau α entspricht der Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art, die Nullhypothese aufgrund der Stichprobe zu verwerfen, obwohl sie zutrifft. In der vorliegenden Arbeit wird $\alpha = 0,05$ gesetzt. Bei einem statistischen Test errechnet man aus den Beobachtungsdaten die Testgröße und ermittelt den zugehörigen P -Wert. Der P -Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese ablehnt. Ist $p > \alpha$, ist das Ergebnis nicht signifikant. Ist $p \leq \alpha$, wäre die beobachtete Abweichung bei Zutreffen der Nullhypothese zwar möglich, aber doch so unwahrscheinlich, dass die Nullhypothese verworfen wird.

2.11.1 Fall-Kontroll-Assoziationsstudien

In einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wird untersucht, ob eine bestimmte Sequenzvariante bei Betroffenen häufiger vorkommt als bei Kontrollpersonen. Dazu wird die Genotypfrequenz in einer Gruppe Betroffener mit der in einer Gruppe Nichtbetroffener (Kontrollen) verglichen. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass der

beobachtete Häufigkeitsunterschied der Genotypwahrscheinlichkeit zwischen den beiden Gruppen zufallsbedingt ist. Die Alternativhypothese H_1 lautet, dass zwischen der Gruppenzugehörigkeit und der Genotypfrequenz eine statistische Abhängigkeit besteht. Mit dem Test nach Mantel-Haenzel werden der zugehörige P -Wert, eine Odds Ratio (OR) sowie ein Konfidenzintervall (CI) ermittelt. Die Odds Ratio gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger des mutmaßlichen Genotyps ist. Zur Berechnung der OR wurden die Häufigkeiten der Markergenotypen (wt \rightarrow Δ 4bp, wt \rightarrow Δ 6bp und 68C \rightarrow T) von Patienten und Kontrollen verglichen. Die Genauigkeit der OR ist durch das Konfidenzintervall, ein Wertebereich der mit einer vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit ($1 - \alpha$) die wahre OR enthält, angegeben. Da die reguläre Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$ beträgt, wird ein 95% CI angegeben. Ein großes CI bekräftigt eine starke Variabilität der Daten (Schlittgen 1991).

2.11.2 Familienbasierte Assoziationsstudie

Während eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie die Patientengruppe mit externen Kontrollen vergleicht, werden beim Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) Kernfamilien mit einem betroffenen Kind untersucht und interne Kontrollen gebildet. Die internen Kontrollen setzen sich aus den nicht transmittierten Allelen der beiden Eltern eines LKGS-Patienten zusammen (Spielman et al. 1993). Die Kontrollen entstammen damit genau derselben ethnischen Gruppe wie die Betroffenen. Der TDT setzt voraus, dass bei heterozygoten Eltern beide Allele gleich häufig transmittiert werden (Tab. 2.16; $b = c$). Nach der Alternativhypothese vererben heterozygote Eltern das mutmaßlich mit dem veränderten Phänotyp assoziierte Allel überzufällig häufig an ihre betroffenen Kinder. Die Prüfgröße ist χ^2 :

$$\chi^2 = (b - c)^2 / (b + c)$$

Der P -Wert wird nach dem exakten McNemar-Test berechnet. Ein signifikantes TDT-Ergebnis bedeutet, es liegt eine Kopplung und Assoziation vor. Ein nicht signifikantes TDT-Ergebnis bedeutet, es liegt weder eine Kopplung noch eine Assoziation des Allels mit LKGS vor.

Tabelle 2.16 Vierfeldertafel im TDT

Bei n Familien wird für die $2n$ Eltern untersucht, welches der beiden Allele A_1 und A_2 sie jeweils an ihr betroffenes Kind transmittiert/nicht transmittiert haben. Von den insgesamt $4n$ Allelen werden $2n$ transmittiert und $2n$ nicht transmittiert.

		nicht transmittierte Allele		
		A_1	A_2	gesamt
transmittierte Allele	A_1	a	b	$a + b$
	A_2	c	d	$c + d$
	gesamt	$a + c$	$b + d$	$2n$

3 Ergebnisse

3.1 Transforming Growth Factor alpha (TGF α)

TGF α ist ein aus 160 Aminosäuren bestehendes transmembranes Glykoprotein mit kurzer cysteinreicher zytoplasmatischer Domäne. Die für TGF α kodierende Nukleotidsequenz liegt beim Menschen auf Chromosom 2p13 und setzt sich aus sechs Exons sowie fünf Introns zusammen. Die Exons weisen eine Größe von 57 bis 150 bp auf. Die Spleißstellen entsprechen der GTAG Regel (Machida et al. 1999).

3.1.1 Untersuchung des Polymorphismus wt \rightarrow Δ 4bp

Untersucht wurde eine Deletion von 4 bp im Intron 5 von TGF α . Es handelt sich bei dieser Deletion um eine Sequenzvariante, die mit einer Frequenz von 0,10 in der kaukasischen Population Iowas/USA vorkommt (Lidral et al. 1998). Diese Deletion konnte nach PCR-Amplifikation und anschließender elektrophoretischer Auftrennung des 117 bp Fragmentes (Wildtyp, wt) und des deletierten 113 bp Fragmentes (Δ 4bp) auf einem 8%igem Polyacrylamidgel nachgewiesen werden.

Einige Studien konnten eine Assoziation des seltenen Allels Δ 4bp zu LK/GS feststellen (Ardinger et al. 1989; Chevenix-Trench et al. 1992; Holder et al. 1992 u.a.). Andere Studien bestätigen diese Assoziation nicht (Hecht et al. 1991; Lidral et al. 1997, 1998). Eine Studie zeigte eine Assoziation der Sequenzvariante Δ 4bp mit GS (Shiang et al. 1993).

Die vorliegende Arbeit soll überprüfen, ob in der deutschen Population das seltene Allel Δ 4bp das Risiko für die Entwicklung einer LKGS erhöht.

3.1.1.1 Assoziationsanalysen

Genotypisiert wurden 37 LK/GS- und 10 GS-Patienten, deren Eltern sowie 111 Kontrollpersonen. Genotypen und Allelfrequenzen sind den Tabellen 3.1 und 3.2 zu entnehmen. In der deutschen Bevölkerung liegt die Frequenz der Sequenzvariante Δ 4bp bei 0,06.

3.1.1.1.1 Fall-Kontroll-Vergleich bei LK/GS-Patienten

Heterozygot waren für den Polymorphismus wt→Δ4bp 30% der LK/GS-Patienten (11/37). Die Allelfrequenz von Δ4bp lag bei 0,15. Bei 19% der Mütter (7/37) und 15% der Väter (5/33) wurde der heterozygote Genotyp wt/Δ4bp nachgewiesen. Einer der Väter wies den Genotyp Δ4bp/Δ4bp auf. Die Allelfrequenz des Allels Δ4bp war bei den Müttern 0,10 und den Vätern 0,11 (Tab. 3.1).

Um zu überprüfen, ob das seltene Allel Δ4bp des Polymorphismus wt→Δ4bp in der deutschen Population das Risiko für die Entstehung von LK/GS erhöht, wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie durchgeführt. Als statistische Parameter wurden eine Odds Ratio (OR), ein 95% Konfidenzintervall (CI) und ein 2-seitiger *P*-Wert nach Mantel-Haenszel berechnet.

Der Vergleich der heterozygoten Genotyphäufigkeiten des Polymorphismus wt→Δ4bp zwischen 14/111 Kontrollpersonen und 11/37 LK/GS-Patienten zeigte einen signifikanten Unterschied (OR = 2,9 [95% CI = 1,2 – 7,2]; *P* = 0,02). Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten zwischen 14/111 heterozygoten Kontrollpersonen und 7/37 heterozygoten Müttern sowie 5/32 Vätern zeigte keinen statistischen Unterschied (Mütter: OR = 1,6 [95% CI = 0,6 – 4,4]; *P* = 0,30; Väter: OR = 1,08 [95 % CI = 0,36 – 3,24]; *P* = 0,89). Einer der Väter war homozygot für das seltene Allel Δ4bp und konnte nicht in den Vergleich der heterozygoten Genotyphäufigkeiten einbezogen werden.

Tabelle 3.1 Genotypverteilung und Allelfrequenzen für den Polymorphismus wt→Δ4bp bei LK/GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen

untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz	
	n	wt/wt	wt/Δ4bp	Δ4bp/Δ4bp	wt	Δ4bp
Kontrollen	111	97	14	0	0,94	0,06
♀	65	56	9	0	0,93	0,07
♂	46	41	5	0	0,94	0,06
Patienten	37	26	11	0	0,85	0,15
♀	10	7	3	0	0,85	0,15
♂	27	19	8	0	0,85	0,15
Mütter	37	30	7	0	0,91	0,10
Väter	33	27	5	1	0,90	0,11

wt (Wildtyp) = 117 bp; Δ4bp = 113 bp; n = Personenanzahl

3.1.1.1.2 Fall-Kontroll-Vergleich bei GS-Patienten

Den heterozygoten Genotyp wt/ Δ 4bp hatten 30% der GS-Patienten (3/10). Die Allelfrequenz von Δ 4bp lag bei 0,15. Bei 40% der Mütter (4/10) und 20% der Väter (2/10) wurde der Genotyp wt/ Δ 4bp nachgewiesen. Die Allelfrequenz des Allels Δ 4bp war bei den Müttern 0,2 und bei den Vätern 0,1. Den Genotyp Δ 4bp/ Δ 4bp zeigte keiner der Probanden (Tab. 3.2).

Um zu überprüfen, ob das seltene Allel Δ 4bp des Polymorphismus wt \rightarrow Δ 4bp in der deutschen Population das Risiko für die Entstehung von GS erhöht, wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie durchgeführt. Als statistische Parameter wurden eine Odds Ratio (OR), ein 95% Konfidenzintervall (CI) und ein 2-seitiger *P*-Wert nach Mantel-Haenszel berechnet.

In dieser Studie wurde ein Vergleich der heterozygoten Genotyphäufigkeiten des Polymorphismus wt \rightarrow Δ 4bp bei GS-Patienten mit Kontrollpersonen der deutschen Population durchgeführt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der Häufigkeit des heterozygoten Genotyps wt/ Δ 4bp zwischen 14/111 Kontrollpersonen und 3/10 GS-Patienten sowie zwischen diesen Kontrollpersonen und 2/10 Vätern festgestellt werden (Patienten: OR = 4,62 [95% CI = 0,69 – 12,97]; *P* = 0,15; Väter: OR = 1,73 [95% CI = 0,33 – 9,0]; *P* = 0,51). Der Vergleich der Genotyphäufigkeit von 14/111 heterozygoten Kontrollpersonen mit 4/10 heterozygoten Müttern zeigt, dass das seltene Δ 4bp-Allel bei Müttern von GS-Patienten statistisch signifikant häufiger auftritt als bei Kontrollpersonen (OR = 4,62 [95% CI = 1,16 – 18,43]; *P* = 0,03). Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten bei 9/65 heterozygoten weiblichen Kontrollpersonen mit 4/10 heterozygoten Müttern ergab keinen signifikanten Unterschied (OR = 4,15 [95% CI = 0,98 – 17,64]; *P* = 0,05).

Tabelle 3.2 Genotypisierung und Allelfrequenzen für den Polymorphismus wt \rightarrow Δ 4bp bei GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen

untersuchte Personen	n	Genotyp			Allelfrequenz	
		wt/wt	wt/ Δ 4bp	Δ 4bp/ Δ 4bp	wt	Δ 4bp
Kontrollen	111	97	14	0	0,94	0,06
♀	65	56	9	0	0,93	0,07
♂	46	41	5	0	0,94	0,06
Patienten	10	7	3	0	0,85	0,15
Mütter	10	6	4	0	0,80	0,20
Väter	10	8	2	0	0,90	0,10

wt (Wildtyp) = 117 bp; Δ 4bp = 113 bp; n = Personenanzahl

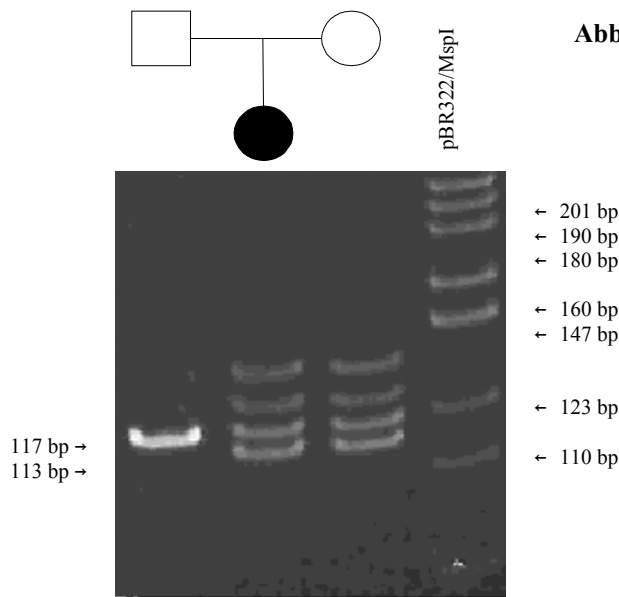


Abb. 3.1 Identifizierung der 4 bp Deletion in Intron 5 des TGF α -Gens auf einem 8% PAA-Gel

Die Abbildung zeigt den Stammbaum der Familie 5056. Die LK/GS-Patientin und ihre Mutter zeigen den Genotyp wt/ Δ 4bp (Allellänge: 117 bp/113 bp). Der Vater der Patientin ist homozygot für das Wildtypallel wt (Allellänge: 117 bp). Heteroduplexfragmente bildeten sich immer bei einer Fragmentlänge zwischen 123 bp und 147 bp.

3.1.1.2 Familienbasierte Assoziationsstudie

Mit diesem Test soll überprüft werden, ob das seltene Allel Δ 4bp von heterozygoten Eltern häufiger an das betroffene Kind vererbt wird als das Wildtypallel wt. Dabei dienen die nicht transmittierten Allele der Eltern als interne Kontrollen. Die statistische Berechnung erfolgt nach McNemar (Spielman et al. 1996).

Für den Polymorphismus wt \rightarrow Δ 4bp wurden 33 LK/GS-Familientrios (66 Elternteile) und 10 GS-Familientrios (20 Elternteile) genotypisiert. Jedes Familientrio bestand aus Mutter, Vater und betroffenem Kind. Die so gewonnenen Daten wurden in den Test auf Assoziation und Kopplung (TDT) eingebracht.

3.1.1.2.1 TDT für LK/GS-Familientrios

Die in der TDT-Vierfeldertafel aufgeführten Daten (Tab. 3.3) zeigen, dass insgesamt 11/66 LK/GS-Elternteile (17%) heterozygot für den Polymorphismus wt \rightarrow Δ 4bp waren. Das Allel Δ 4bp wurde in 9/11 Fällen an das betroffene Kind transmittiert und in 2/11 Fällen nicht transmittiert. Homozygot waren für das Wildtypallel wt 54/66 Elternteile. Ein Elternteil war homozygot für die Sequenzvariante Δ 4bp. Die statistische Berechnung eines 2-seitigen P -Wertes nach McNemar ergab eine statistische Signifikanz ($P = 0,04$). Die Sequenzvariante Δ 4bp ist mit LK/GS assoziiert und gekoppelt.

Tabelle 3.3 TDT-Vierfeldertafel für LK/GS

transmittierte Allele		nicht transmittierte Allele		
		wt	$\Delta 4bp$	gesamt
wt		54	2	56
$\Delta 4bp$		9	1	10

wt (Wildtyp) = 117 bp; $\Delta 4bp$ = 113 bp

3.1.1.2.2 TDT für GS-Familientrios

Drei heterozygote Elternteile transmittierten das Allel $\Delta 4bp$ an das betroffene Kind und drei Eltern transmittierten dieses Allel nicht. Homozygot für das Wildtypallel wt waren 14/20 Elternteile (Tab. 3.4). Eine statistische Berechnung wurde aufgrund der geringen Patientenanzahl nicht vorgenommen.

Tabelle 3.4 TDT-Vierfeldertafel für GS

transmittierte Allele		nicht transmittierte Allele		
		wt	$\Delta 4bp$	gesamt
wt		14	3	17
$\Delta 4bp$		3	-	3

wt (Wildtyp) = 117 bp; $\Delta 4bp$ = 113 bp

3.1.1.3 Familiäre Häufung der LKGS

Um zu überprüfen, ob das seltene Allel $\Delta 4bp$ der Sequenzvariante $wt \rightarrow \Delta 4bp$ verstärkt bei Familien mit LK/GS oder GS bei Verwandten 1. Grades auftritt, wurden die Probanden vor Aufnahme in die Studie mittels eines Fragebogens nach weiteren Betroffenen in der Familie befragt.

3.1.1.3.1 LK/GS-Patienten

Bei 10 der 37 der LK/GS-Patienten konnte eine familiäre Häufung beobachtet werden. Nur einer der Patienten zeigte den Genotyp $wt/\Delta 4bp$ (1/10).

Der Genotyp $wt/\Delta 4bp$ konnte bei 10 der 27 sporadischen LK/GS-Fälle beobachtet werden.

3.1.1.3.2 GS-Patienten

Keiner der Verwandten 1. Grades der GS-Patienten zeigte den Phänotyp einer Gaumenspalte. Der Cousin eines GS-Patienten zeigte eine LK/GS (Fam. 5009).

3.1.1.4 Unilaterale und bilaterale LK/GS

Um zu überprüfen, ob das seltene Allel $\Delta 4\text{bp}$ des Polymorphismus $\text{wt} \rightarrow \Delta 4\text{bp}$ verstärkt bei unilateraler oder bilateraler LK/GS auftritt, wurde der Schweregrad der LK/GS nach dem Thallwitzer Klassifikationsschema ermittelt.

Den Genotyp $\text{wt}/\Delta 4\text{bp}$ zeigten 3/11 Patienten mit bilateraler LK/GS (0,27) sowie 8/26 der Patienten mit unilateraler LK/GS (0,31). Homozygot für das seltene Allel $\Delta 4\text{bp}$ war keiner der Patienten.

3.1.2 Untersuchung der Mikrosatellitenregion D2S443

Untersucht wurde eine Mikrosatellitenregion in der Nähe von *TGF α* auf Chromosom 2p. Diese Region setzt sich aus repetitiven Tetranukleotiden (AAGG) zusammen (Wyszynsky et al. 1997; Acc. G08201). Insgesamt werden 12 Allele unterschieden. Wyszynsky und Mitarbeiter (1997) berichten über eine statistisch nicht signifikant häufigere Transmission des Allels 8 bei LK/GS-Patienten in den USA. In einer weiteren Studie wurde eine häufigere Transmission des Allels 4 an betroffene Personen festgestellt (Maestri et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit soll mit einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie und einer familienbasierten Assoziationsstudie geprüft werden, ob eines der Allele der Mikrosatellitenregion D2S443 mit LKGS assoziiert ist.

Schwierigkeiten bei der Benennung der Allele ergeben sich aus der Tatsache, dass die Autoren der oben genannten Studien die Größe der Allele nicht angeben. Die Benennung der hier aufgeführten Allele erfolgt nach der PCR-Produktlänge.

Die Mikrosatellitenregion D2S443 wurde bei 98 Kontrollpersonen durch PCR amplifiziert. Mit der automatischen DNA-Fragmentlängenmessung mittels der Computersoftware GeneScan[®] wurden diese 98 Kontrollpersonen anschließend genotypisiert. Das kleinste beobachtete Allel mit einer Fragmentlänge von 215 bp

erhielt die Bezeichnung Allel A1. Das größte Allel wies eine Fragmentlänge von 259 bp auf und erhielt die Bezeichnung Allel A12.

3.1.2.1 Allelfrequenzen der Mikrosatellitenregion D2S443

Es wurden 37 LK/GS- und 10 GS-Patienten, deren Eltern und 98 Kontrollpersonen genotypisiert. Die Allelfrequenzen können den Tabellen 3.6 und 3.7 entnommen werden. Bei den Kontrollpersonen traten die Allele A6 und A7 am häufigsten auf. Die Allelfrequenz des Allels A6 lag bei 0,29 (57/196 Allelen) und des Allels A7 bei 0,31 (61/196 Allelen). Die Allele A5 und A8 traten mit einer geringeren Frequenz auf als die Allele A6 und A7 (A5: 0,09 (18/196); A8: 0,10 (20/196)).

3.1.2.1.1 Allelfrequenzen bei LK/GS-Patienten

Die häufigsten Allele bei LK/GS-Patienten waren die Allele A6 und A7. Die Allelfrequenz bei LK/GS-Patienten war für Allel A6 0,19 (14/74) und für Allel A7 0,31 (23/74). Die Allelfrequenz des Allels A5 war 0,15 (11/74). Allel A8 trat bei LK/GS-Patienten mit einer Häufigkeit von 0,09 (7/34) auf. Weitere Allelfrequenzen können der Tabelle 3.5 entnommen werden.

Da die Frequenzen der Allele A5 und A6 bei LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen stark divergieren (Differenz A5: 0,06; A6: 0,10), wurde geprüft, ob eine Assoziation dieser Allele der Mikrosatellitenregion D2S443 mit LK/GS vorliegt. Als statistische Parameter wurden eine Odds Ratio (OR), ein 95% Konfidenzintervall (CI) und ein 2-seitiger *P*-Wert nach Mantel-Haenszel berechnet.

Der Allelfrequenzvergleich für Allel A5 bei 18/196 Kontrollallelen mit 14/74 Allelen von LK/GS-Patienten ergab keinen signifikanten Unterschied (OR = 1,73 [95% CI = 0,77 – 3,86]; *P* = 0,18). Der Allelfrequenzvergleich für Allel A6 von 57/196 Kontrollallelen mit 14/74 Allelen der LK/GS-Patienten ergab ebenfalls keinen statistischen Unterschied (OR = 0,57 [95% CI = 0,30 – 1,10]; *P* = 0,09). Weder Allel A5 noch Allel A6 ist mit LK/GS assoziiert.

3.1.2.1.2 Allelfrequenzen bei GS-Patienten

Bei GS-Patienten wurden die Allele A6 und A7 am häufigsten beobachtet. Die Allelfrequenz für Allel A6 lag bei 0,40 (8/20) und für Allel A7 bei 0,20 (4/20). Die Allelfrequenz von Allel A5 war 0,10 (2/20). Allel A8 trat mit einer Häufigkeit von 0,05 (1/20) auf. Eine statistische Berechnung wurde aufgrund der geringen Anzahl an Patienten nicht vorgenommen.

Abb. 3.2 Darstellung der Allelfrequenzen bei LKGS-Patienten und Kontrollpersonen

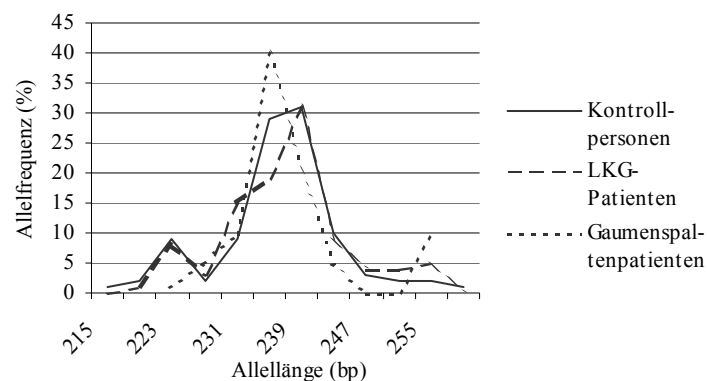
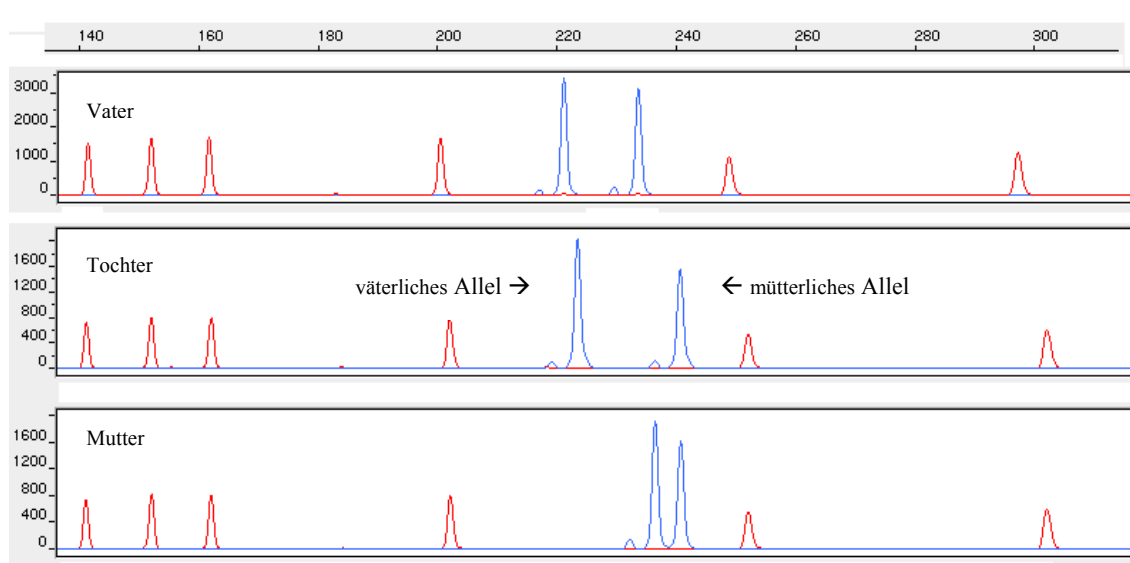


Abb. 3.3 Elektropherogramm einer LK/GS-Familie (Fam.-Nr. 5021)

Die blauen Kurven zeigen die nachgewiesenen DNA-Fragmente. Anhand der Fragmentgrößen kann eine genaue Zuordnung der Allele getroffen werden. Das kleinere Allel A3 (223 bp) wurde vom Vater, das größere Allel A7 (239 bp) von der Mutter an die Tochter vererbt. Bei den roten Kurven handelt es sich um einen Längenstandard. Das väterliche Allel ist aufgrund der Verschiebung des Längenstandards nicht deckungsgleich mit dem kindlichen Allel.



3.1.2.2 Familienbasierte Assoziationsstudie

Dieser Test soll überprüfen, ob eines der 12 Allele des Polymorphismus D2S443 von heterozygoten Eltern häufiger an das betroffene Kind vererbt wird. Dabei dienen die nicht transmittierten Allele heterozygoter Eltern als interne Kontrollen.

Für D2S443 wurden 33 LK/GS-Familientrios (66 Elternteile mit 33 betroffenen Kindern) und 10 GS-Familientrios (20 Elternteile mit 10 betroffenen Kindern) genotypisiert. Die Ergebnisse wurden in die familienbasierte Assoziationsstudie (TDT) eingebracht. Die statistische Berechnung erfolgt nach McNemar (Spielman et al. 1996).

3.1.2.2.1 TDT für LK/GS-Familientrios

Insgesamt waren 48 LK/GS-Elternteile heterozygot. Acht heterozygote Elternteile transmittierten Allel A5 (8/13) und sechs transmittierten Allel A5 nicht (6/13). Allel A6 wurde von heterozygoten Eltern seltener transmittiert (7/18) als nicht transmittiert (11/18).

Die statistische Berechnung eines 2-seitigen *P*-Wertes nach McNemar ergab weder für Allel A5 noch für Allel A6 eine statistische Signifikanz (A5: $P = 0,20$; A6: $P = 0,25$). Eine Assoziation oder Kopplung der Allele A5 und A6 des Polymorphismus D2S443 mit LK/GS liegt in der deutschen Population nicht vor.

Tabelle 3.5 TDT-Vierfeldertafel

Die TDT-Vierfeldertafel zeigt die Transmission der Allele bei den 33 LK/GS-Familientrios.

		nicht transmittierte Allele											
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
transmittierte Allele	A1								1				
	A2												
	A3				1	2	2	1					
	A4				1		1						
	A5					2	2	2	3	1			
	A6		1	1			6	3	2			1	
	A7			2			6	8	2	1			
	A8			1		2		1	1				
	A9							2					
	A10				1			1				1	
	A11					1			2	1			
	A12												

Tabelle 3.6 Allelfrequenzen des Polymorphismus D2S443 bei LK/GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen
A1 = 215 bp; A2 = 219 bp; A3 = 223 bp; A4 = 227 bp; A5 = 231 bp; A6 = 235 bp; A7 = 239 bp; A8 = 243 bp; A9 = 247 bp; A10 = 251 bp;
A11 = 255 bp; A12 = 259 bp
n = Personenanzahl

untersuchte Personen		Allelfrequenz											
	n	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Kontrollen	98	1 (0,01)	3 (0,02)	17 (0,09)	4 (0,02)	18 (0,09)	57 (0,29)	61 (0,31)	20 (0,10)	6 (0,03)	4 (0,02)	4 (0,02)	1 (0,01)
♀	57	-	2 (0,02)	9 (0,08)	3 (0,03)	13 (0,11)	31 (0,27)	33 (0,29)	12 (0,11)	6 (0,05)	2 (0,02)	2 (0,02)	1 (0,01)
♂	41	1 (0,01)	1 (0,01)	8 (0,10)	1 (0,01)	5 (0,06)	26 (0,32)	28 (0,35)	8 (0,10)	-	2 (0,02)	2 (0,02)	-
Patienten	37	-	1 (0,01)	6 (0,08)	2 (0,03)	11 (0,15)	14 (0,19)	23 (0,31)	7 (0,09)	3 (0,04)	3 (0,04)	4 (0,05)	-
♀	10	-	-	2 (0,10)	-	3 (0,15)	6 (0,30)	5 (0,25)	2 (0,10)	-	2 (0,10)	-	-
♂	27	-	1 (0,02)	4 (0,07)	2 (0,04)	8 (0,15)	8 (0,15)	18 (0,33)	5 (0,09)	3 (0,06)	1 (0,02)	4 (0,07)	-
Mütter	37	1 (0,01)	-	4 (0,05)	2 (0,03)	9 (0,12)	19 (0,26)	23 (0,31)	8 (0,11)	5 (0,07)	1 (0,01)	2 (0,03)	-
Väter	33	-	1 (0,02)	6 (0,09)	3 (0,04)	6 (0,09)	15 (0,23)	18 (0,27)	9 (0,14)	2 (0,03)	3 (0,04)	4 (0,06)	-

Tabelle 3.7 Allelfrequenzen des Polymorphismus D2S443 bei GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen
A1 = 215 bp; A2 = 219 bp; A3 = 223 bp; A4 = 227 bp; A5 = 231 bp; A6 = 235 bp; A7 = 239bp; A8 = 243 bp; A9 = 247 bp; A10 = 251 bp;
A11 = 255 bp; A12 = 259 bp
n = Personenanzahl

untersuchte Personen		Allelfrequenz											
	n	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Kontrollen	98	1 (0,01)	3 (0,02)	17 (0,09)	4 (0,02)	18 (0,09)	57 (0,29)	61 (0,31)	20 (0,10)	6 (0,03)	4 (0,02)	4 (0,02)	1 (0,01)
♀	57	-	2 (0,02)	9 (0,08)	3 (0,03)	13 (0,11)	31 (0,27)	33 (0,29)	12 (0,11)	6 (0,05)	2 (0,02)	2 (0,02)	1 (0,01)
♂	41	1 (0,01)	1 (0,01)	8 (0,10)	1 (0,01)	5 (0,06)	26 (0,32)	28 (0,35)	8 (0,10)	-	2 (0,02)	2 (0,02)	-
Patienten	10	-	-	2 (0,10)	1 (0,05)	1 (0,10)	8 (0,40)	4 (0,20)	1 (0,05)	-	-	2 (0,10)	-
Mütter	10	-	-	3 (0,15)	-	4 (0,20)	6 (0,30)	4 (0,20)	1 (0,05)	1 (0,05)	-	1 (0,05)	-
Väter	10	-	-	2 (0,10)	1 (0,05)	3 (0,15)	4 (0,20)	6 (0,30)	2 (0,10)	-	1 (0,05)	1 (0,05)	-

3.1.2.2.2 TDT für GS-Familientrios

Insgesamt waren 17/20 GS-Elternteile heterozygot. Allel A6 wurde von heterozygoten Eltern häufiger transmittiert (8/10) als nicht transmittiert (2/10). Allel A5 transmittierte ein heterozygoter Elternteil (1/5) und vier Elternteile transmittierten Allel A5 nicht (4/5). Eine statistische Berechnung wurde aufgrund der geringen Anzahl an GS-Patienten nicht vorgenommen.

Tabelle 3.8 TDT-Vierfeldertafel

Die TDT-Vierfeldertafel zeigt die Transmission der Allele bei den 10 GS-Familientrios

		nicht transmittierte Allele											
transmittierte Allele		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
	A1												
	A2												
	A3			1				1					
	A4								1				
	A5					1	1						
	A6			1		3		3		1			
	A7						1	2	1				
	A8			1									
	A9												
	A10												
	A11					1					1		
	A12												

3.1.3 Informationsgehalt der Familien

Nach Genotypisierung für den Polymorphismus wt→ Δ 4bp konnte nur bei 27,2% der LK/GS-Familientrios (9/33), bei 25% der LK/GS-Mutter-Kind-Paare (1/4) sowie bei 60% der GS-Familien (6/10) eine Zuordnung der elterlichen Allele zu den Allelen der Patienten getroffen werden. Nach der Genotypisierung für den Polymorphismus D2S443 war bei allen LK/GS- und GS-Familientrios sowie bei 50% der LK/GS-Mutter-Kind-Paare (2/4) eine Allelzuordnung möglich.

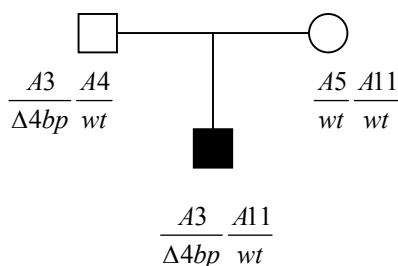


Abb. 3.4 Genotypverteilung der Polymorphismen

D2S443 und wt→ Δ 4bp bei Familie 5043

Das Allel $\frac{A3}{\Delta 4bp}$ wurde vom Vater und das

Allel $\frac{A11}{wt}$ von der Mutter an das betroffene

Kind mit LK/GS vererbt.

3.2 Transforming Growth Factor beta 3 (TGF β 3)

TGF β 3 ist ein Wachstumsfaktor und gehört der Transforming Growth Factor beta Familie (TGF β) an. Insgesamt werden drei Mitglieder unterschieden. Sie regulieren die Zellproliferation, Migration und Differenzierung sowie die Epithel-Mesenchym-Transformation. *TGF β 3* ist auf Chromosom 14p24 lokalisiert und besteht aus 7 Exons und 6 Introns. Die Spleißstellen sind hoch konserviert. *TGF β 3* weist eine sehr große Ähnlichkeit zu *TGF β 1* auf (Derynck et al. 1988).

3.2.1 Untersuchung des Polymorphismus wt \rightarrow Δ 6bp

Untersucht wurde eine 6 bp Deletion in der Promotorregion von *TGF β 3*. Diese Region setzt sich aus 6 bp-Wiederholungen zusammen. Es handelt sich um eine Sequenzvariante, die mit einer Frequenz von 0,06 in der kaukasischen Bevölkerung Iowas/USA vorkommt (Lidral et al. 1998). Die 5'UTR.1-Primer generieren in der PCR ein 254 bp-Fragment (wt) und beim Vorliegen der Deletion ein 248 bp-Fragment (Δ 6bp). Die Fragmente wurden auf einem 6%igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt.

Lidral und Mitarbeiter (1998) konnten eine Assoziation und eine Kopplung des Allels Δ 6bp mit LK/GS nachweisen. Für GS konnte die Studie keine Assoziation oder Kopplung feststellen. Die vorliegende Arbeit soll überprüfen, ob in der deutschen Population das Allel Δ 6bp das Risiko für die Entwicklung einer LKGS erhöht.

3.2.1.1 Assoziationsanalysen

Genotypisiert wurden 37 LK/GS- und 10 GS-Patienten, deren Eltern sowie 129 Kontrollpersonen. Allelfrequenzen und Genotypen können den Tabellen 3.9 und 3.10 entnommen werden. In der deutschen Bevölkerung liegt die Frequenz der Sequenzvariante Δ 6bp bei 0,04.

3.2.1.1.1 Fall-Kontroll-Vergleich bei LK/GS-Patienten

Heterozygot für den Polymorphismus wt→Δ6bp waren 8% der LK/GS-Patienten (3/37).

Die Allelfrequenz des Allels Δ6bp lag bei 0,04. Heterozygot für wt→Δ6bp waren 5% der Mütter (2/37) und 9% der Väter (3/34). Die Allelfrequenz des Allels Δ6bp lag bei den Müttern bei 0,03 und bei den Vätern bei 0,04. Keiner der Probanden wurde für das seltene Allel Δ6bp als homozygot genotypisiert (Tab. 3.9).

Eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob das seltene Allel Δ6bp des Polymorphismus wt→Δ6bp in der deutschen Bevölkerung das Risiko für die Entstehung der LK/GS erhöht. Hierzu wurde eine statistische Berechnung nach Mantel-Haenszel durchgeführt. Berechnet wurden ein 95% Konfidenzintervall (95% CI), eine Odds Ratio (OR) und ein 2-seitiger *P*-Wert.

Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten des Polymorphismus wt→Δ6bp bei 11/129 heterozygoten Kontrollpersonen mit 3/37 heterozygoten LK/GS-Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied (OR = 0,95 [95% CI = 0,25 – 3,59]; *P* = 0,94). Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten von 11/129 heterozygoten Kontrollpersonen mit 7/37 heterozygoten Müttern sowie mit 3/33 Vätern lieferte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Mütter: OR = 0,61; [95% CI = 0,13 – 2,9]; *P* = 0,54; Väter: OR = 1,07; [95% CI = 0,28 – 4,09]; *P* = 0,92).

Tabelle 3.9 Genotyphäufigkeiten und Allelfrequenzen des Polymorphismus wt→Δ6bp bei LK/GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen

untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz	
	n	wt/wt	wt/Δ6bp	Δ6bp/Δ6bp	wt	Δ6bp
Kontrollen	129	118	11	0	0,96	0,04
♀	71	62	9	0	0,94	0,06
♂	58	56	2	0	0,98	0,02
Patienten	37	34	3	0	0,96	0,04
♀	11	10	1	0	0,95	0,05
♂	26	24	2	0	0,96	0,04
Mütter	37	35	2	0	0,97	0,03
Väter	33	30	3	0	0,96	0,05

wt = 254 bp; Δ6bp = 248 bp; n = Personenanzahl

3.2.1.1.2 Fall-Kontroll-Vergleich bei GS-Patienten

Für den Polymorphismus wt→Δ6bp waren 10% der GS-Patienten (1/10) heterozygot. Die Allelfrequenz des Allels Δ6bp lag bei 0,05. Das Allel Δ6bp konnte bei 20% der Väter (2/10; Allelfrequenz: 0,01) jedoch nicht bei Müttern (0/10) nachgewiesen werden. Keiner der Probanden zeigte den Genotyp Δ6bp/Δ6bp (Tab. 3.10).

Eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob das seltene Allel Δ6bp in der deutschen Bevölkerung das Risiko für die Entstehung der GS erhöht. Hierzu wurde eine statistische Berechnung nach Mantel-Haenszel durchgeführt. Berechnet wurden ein 95% Konfidenzintervall (95% CI), eine Odds Ratio (OR) und ein 2-seitiger *P*-Wert.

Keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigte der Vergleich der Genotyphäufigkeiten von 11/129 heterozygoten Kontrollpersonen mit 1/10 heterozygoten GS-Patienten und 2/10 heterozygoten Vätern (Patienten: OR = 1,19; [95% CI = 0,14 – 10,3]; *P* = 0,87; Väter: OR = 2,68 [95% CI = 0,51 – 14,22]; *P* = 0,25). Das Allel Δ6bp wurde bei den Müttern nicht beobachtet. Aus diesem Grund ist die Berechnung der statistischen Parameter nicht möglich.

Tabelle 3.10 Genotyphäufigkeiten und Allelfrequenzen des Polymorphismus wt→Δ6bp bei GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen

untersuchte Personen	n	Genotyp			Allelfrequenz	
		wt/wt	wt/Δ6bp	Δ6bp/Δ6bp	wt	Δ6bp
Kontrollen	129	118	11	0	0,96	0,04
♀	71	62	9	0	0,94	0,06
♂	58	56	2	0	0,98	0,02
Patienten	10	9	1	0	0,95	0,05
Mütter	10	10	0	0	1,00	0,00
Väter	10	8	2	0	0,90	0,01

wt = 254 bp; Δ6bp = 248 bp; n = Personenanzahl

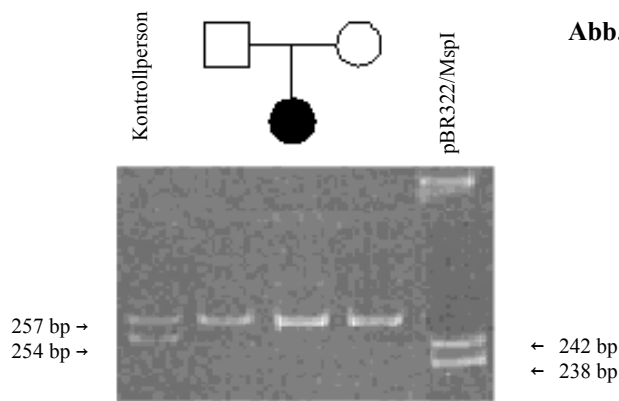


Abb. 3.5 Identifizierung einer 6 bp Deletion in der Promotorregion des TGF β 3-Gens

Dargestellt ist der Stammbaum der Familie 5012. Die Allele der LK/GS-Patientin und ihrer Eltern zeigen keine Deletion. Alle Individuen sind homozygot für das Wildtypallel wt. Zur Kontrolle wird immer eine heterozygote Kontrollperson mit dem Genotyp wt/ Δ 6bp auf das Gel aufgetragen. Die Allellänge beträgt für wt 254 bp und für Δ 6bp 248 bp.

3.2.1.2 Familienbasierte Assoziationsstudie

Mit diesem Test soll überprüft werden, ob die Sequenzvariante Δ 6bp von heterozygoten Eltern häufiger an das betroffene Kind vererbt wird als das Wildtypallel wt. Dabei dienen die nicht transmittierten Allele heterozygoter Eltern als interne Kontrollen. Die statistische Auswertung erfolgt nach McNemar (Spielman et al. 1996).

Die Daten der Genotypisierung bezüglich des Polymorphismus wt \rightarrow Δ 6bp bei 33 LK/GS-Familiendios (66 Elternteile und 33 betroffene Kinder) und 10 GS-Familiendios (20 Elternteile und 10 betroffene Kinder) wurden in den Test auf Assoziation und Kopplung (TDT) eingebracht.

3.2.1.2.1 TDT für LK/GS-Familiendios

Von den 5 heterozygoten Elternteilen der LK/GS-Patienten transmittierten das Allel Δ 6bp 3 Elternteile an ihre Kinder und 2 Elternteile nicht. Homozygot für das Wildtypallel wt waren 61 der 66 Elternteile (Tab. 3.11).

Für den TDT wurde die statistische Berechnung eines 2-seitigen *P*-Wertes nach McNemar vorgenommen, die keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigte (*P* = 0,66). Es besteht weder eine Kopplung noch eine Assoziation der Sequenzvariante Δ 6bp mit LK/GS.

Tabelle 3.11 TDT-Vierfeldertafel für LK/GS

transmittierte Allele		nicht transmittierte Allele	
		wt	Δ 6bp
wt		61	2
Δ 6bp		3	-

wt (Wildtyp) = 254 bp; Δ 6bp = 248 bp

3.2.1.2.2 TDT für GS-Familiëntrios

Von den insgesamt 2 heterozygoten Elternteilen von GS-Patienten wurde das Allel $\Delta 6bp$ in einem Fall an das betroffene Kind transmittiert und in einem Fall nicht transmittiert. Homozygot für das Wildtypallel wt waren 18 von 20 Elternteilen (Tab. 3.12). Eine statistische Berechnung wurde aufgrund der geringen Patientenzahl nicht vorgenommen.

Tabelle 3.12 TDT-Vierfeldertafel für GS

transmittierte Allele		nicht transmittierte Allele	
		wt	$\Delta 6bp$
wt		18	1
$\Delta 6bp$		1	-

wt (Wildtyp) = 254 bp; $\Delta 6bp$ = 248 bp

3.2.2 Untersuchung des Polymorphismus 68C→T

Untersucht wurde der Basenaustausch C → T an Position 68 im Intron 4 des TGF β 3-Gens (Lidral et al. 1998). Es handelt sich dabei um eine Sequenzvariante, die mit einer Häufigkeit von 6% in der Bevölkerung Iowas/USA vorkommt (Lidral et al. 1998).

Zwei Studien untersuchten den Polymorphismus 68C→T (Lidral et al. 1998; Romitti et al. 1999). Nur Lidral und Mitarbeiter (1998) konnten eine Assoziation und Kopplung im TDT der Sequenzvariante T zu LK/GS feststellen. Alle Fall-Kontroll-Assoziationsstudien konnten keine Assoziation des seltenen Allels T mit LKGS nachweisen. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob das seltene Allel T des Polymorphismus 68C→T in der deutschen Bevölkerung das Risiko für die Entwicklung einer LKGS erhöht.

3.2.2.1 Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) und Sequenzierung des Polymorphismus 68C→T

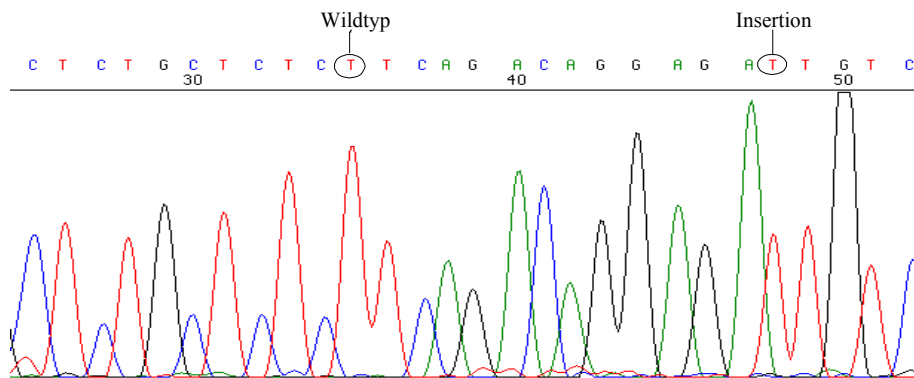
Beim Vorliegen eines heterozygoten Genotyps konnten zwei DNA-Fragmente nach PCR-Amplifikation mit X5.1-Primern und Auftrennung der DNA-Fragmente durch SSCA (Einzelstrang-Konformations-Analyse) nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der DNA-Fragmente bei zwei Kontrollpersonen bestätigte den Basenaustausch C → T.

Sequenziert wurden die DNA-Fragmente der heterozygoten Kontrollpersonen M225 und M202. Sowohl das in seinem Laufverhalten im elektrischen Feld veränderte als auch das normale DNA-Fragment wurden sequenziert.

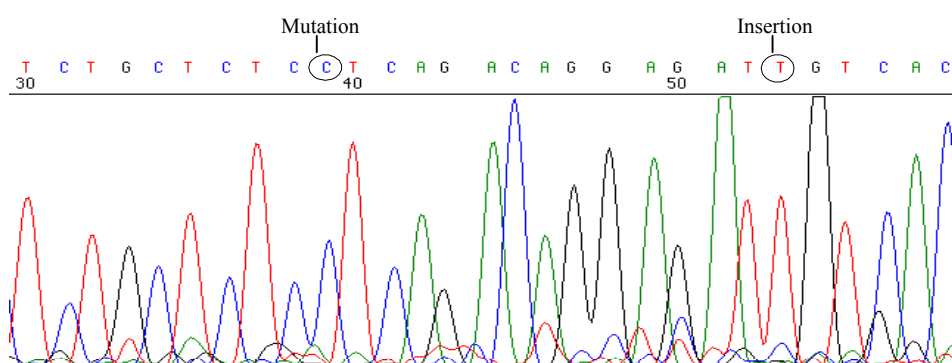
In Abbildung 3.6 ist die Sequenz der Allele des Polymorphismus 68C→T dargestellt. Zusätzlich konnte 13 bp stromabwärts eine Insertion des Nukleotids Thymin sowohl in der Wildtypsequenz als auch im sequenzveränderten DNA-Fragment beobachtet werden. Diese Insertion wird von Lidral und Mitarbeitern (1998) nicht beschrieben.

Abb. 3.6 Sequenzierung des Basenaustausches 68C→T in Intron 4 von *TGFβ3* (DNA-Fragment der Kontrollperson M202)

- a) Dargestellt ist die Wildtypsequenz. An Position 48/49 befindet sich im Vergleich mit der Sequenz Acc.X14889 (Lidral) eine Insertion eines Thymins.



- b) Dargestellt ist die Sequenzvariante 68T→C. Diese Mutation befindet sich im hier gezeigten sequenzierten DNA-Fragment an Position 39. An Position 52/53 findet sich die Insertion des Thymins.



3.2.2.2 Assoziationsanalysen

Genotypisiert wurden 35 LK/GS-Patienten und 10 GS-Patienten, deren Eltern und 88 nicht betroffene Kontrollpersonen. In der deutschen Bevölkerung liegt die Frequenz des Allels T bei 0,06. Alle Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten können den Tabellen 3.13 und 3.14 entnommen werden.

3.2.2.2.1 Fall-Kontroll-Vergleich bei LK/GS-Patienten

Keiner der 35 LK/GS-Patienten hatte das Allel T (0/35). Den heterozygoten Genotyp C/T zeigten 9% der Mütter (3/35) und 9% der Väter (3/32). Die Allelfrequenz des Allels T war bei den Müttern 0,04 und bei den Vätern 0,05. Homozygot für die Sequenzvariante T war keiner der Probanden.

Um zu testen, ob die Sequenzvariante T in der deutschen Population das Risiko für LK/GS erhöht, wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie durchgeführt. Hierfür wurde eine statistische Berechnung nach Mantel-Haenszel durchgeführt. Berechnet wurden ein 95% Konfidenzintervall (95% CI), eine Odds Ratio (OR) ein 2-seitiger *P*-Wert.

Da bei Patienten mit LK/GS das Allel T nicht beobachtet werden konnte, war der statistische Vergleich der Genotyphäufigkeiten von 10/88 heterozygoten Kontrollpersonen mit 0/35 LK/GS-Patienten nicht möglich. Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten von 10/88 heterozygoten Kontrollpersonen mit 3/35 heterozygoten Müttern bzw. 3/32 Vätern ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (Mütter: OR = 0,73 [95% CI = 0,19 - 2,83]; *P* = 0,65; Väter: OR = 0,81 [95% CI = 0,21 - 3,14]; *P* = 0,81).

Tabelle 3.13 Genotyphäufigkeiten und Allelfrequenzen des Polymorphismus 68C→T bei LK/GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen

untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz	
	n	C/C	C/T	T/T	C	T
Kontrollen	88	78	10	0	0,94	0,06
♀	53	43	10	0	0,91	0,09
♂	35	35	0	0	1,00	0,00
Patienten	35	35	0	0	1,00	0,00
♀	10	10	0	0	1,00	0,00
♂	25	25	0	0	1,00	0,00
Mütter	35	32	3	0	0,96	0,04
Väter	32	29	3	0	0,95	0,05

C: Wildtypallel; T: Sequenzvariante; n = Personenanzahl

3.2.2.2.2 Fall-Kontroll-Vergleich bei GS-Patienten

Heterozygot für den Polymorphismus C→T waren 25% der GS-Patienten (2/8) und 50% der Mütter (5/10). Die Allelfrequenz für T lag bei den GS-Patienten bei 0,1 und bei den Müttern bei 0,25. Keiner der Väter (0/10) hatte das seltene Allel T. Der Genotyp T/T konnte nicht nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, ob das seltene Allel T des Polymorphismus 68C→T das Risiko für die Entstehung einer GS erhöht, wurde eine statistische Berechnung nach Mantel-Haenszel durchgeführt. Berechnet wurden ein 95% Konfidenzintervall (95% CI), eine Odds Ratio (OR) ein 2-seitiger *P*-Wert.

Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten des Polymorphismus 68C→T von 10/88 heterozygoten Kontrollpersonen mit 2/10 heterozygoten GS-Patienten zeigte keinen statistischen Unterschied (OR = 1,95 [95% CI = 0,36 – 10,5]; *P* = 0,44). Der Vergleich von 10/88 heterozygoten Kontrollpersonen sowie 10/43 heterozygoten weiblichen Kontrollpersonen mit 5/10 heterozygoten Müttern war statistisch signifikant (OR = 7,8 [95% CI = 1,92 – 31,74]; *P* = 0,004; OR = 4,3 [95% CI = 1,04 – 17,75]; *P* = 0,04). Das Allel T des Polymorphismus 68C→T bei GS-Müttern ist somit mit GS assoziiert. Die Berechnung der statistischen Parameter der Väter ist aufgrund des Fehlens der Sequenzvariante T nicht möglich.

Tabelle 3.14 Genotyphäufigkeiten und Allelfrequenzen für den Polymorphismus 68C→T bei GS-Patienten, deren Eltern und nicht betroffenen Kontrollpersonen

untersuchte Personen	n	Genotyp			Allelfrequenz	
		C/C	C/T	T/T	C	T
Kontrollen	88	78	10	0	0,94	0,06
♀	53	43	10	0	0,91	0,09
♂	35	35	0	0	1,00	0,00
Patienten	10	8	2	0	0,90	0,10
Mütter	10	5	5	0	0,75	0,25
Väter	10	10	0	0	1,00	0,00

C: Wildtypallel; T: Sequenzvariante; n = Personenanzahl

3.2.2.3 Familienbasierte Assoziationsstudie

Mit diesem Test soll überprüft werden, ob das seltene Allel T von heterozygoten Eltern häufiger an das betroffene Kind vererbt wird als das Allel C. Dabei dienen die nicht transmittierten Allele der Eltern als interne Kontrollen. Die statistische Auswertung erfolgt nach McNemar (Spielman et al. 1996).

Für den Polymorphismus 68C→T wurden 30 LK/GS-Familientrios (60 Elternteile und 30 betroffene Kinder) und 10 GS-Familientrios (20 Elternteile und 10 betroffene Kinder) genotypisiert. Die Ergebnisse dieser Genotypisierung wurden in den Test auf Assoziation und Kopplung (TDT) eingebracht.

3.2.2.3.1 TDT für LK/GS-Familientrios

Keiner der 3 heterozygoten Elternteile transmittierte das seltene Allel T (Tab. 3.15). Homozygot für das Wildtypallel C waren 57 von 60 Elternteilen.

Für den TDT wurde eine statistische Berechnung eines 2-seitigen *P*-Wertes nach McNemar durchgeführt. Diese ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 0,083$). Es besteht weder eine Assoziation noch eine Kopplung der Sequenzvariante T mit LK/GS.

Tabelle 3.15 TDT-Vierfeldertafel für LK/GS

transmittierte Allele		nicht transmittierte Allele	
		C	T
C		57	3
T		-	-

C: Wildtypallel; T: Sequenzvariante

3.2.2.3.2 TDT für GS-Familientrios

Von den insgesamt 5 heterozygoten Elternteilen der GS-Patienten wurde das Allel T in 2 Fällen an das betroffene Kind transmittiert und in 3 Fällen nicht transmittiert. Homozygot für das Wildtypallel C waren 15 der 20 Elternteile. Eine statistische Berechnung wurde aufgrund der geringen Fallzahl nicht vorgenommen.

Tabelle 3.16 TDT-Vierfeldertafel

transmittierte Allele		nicht transmittierte Allele	
		C	T
C		15	3
T		2	-

C: Wildtypallel; T: Sequenzvariante

3.3 Medikamenteneinnahme und Zigarettenrauchen der Mütter während der Schwangerschaft

Die Lippen-Kiefer- und Gaumenentwicklung findet in der 5. – 12. Entwicklungswoche statt. In dieser Phase (Organogenese) ist der Embryo gegenüber schädigenden Faktoren besonders anfällig (Sadler & Langman 1998). Aus diesem Grund wurde eine genaue Befragung der Mütter der Patienten bezüglich der Rauchgewohnheiten, der Medikamenteneinnahme und Krankheiten während der Schwangerschaft vorgenommen.

3.3.1 LK/GS-Patienten

Zwei der Mütter gaben an, während der frühen Schwangerschaft Zigaretten geraucht zu haben (Fam. 5045 und 5018). In beiden Fällen entwickelte das Kind eine sporadische einseitige LK/GS. Bei beiden Kindern konnte weder das seltene Allel $\Delta 4\text{bp}$ des $\text{TGF}\alpha$ -Gens, noch eines der seltenen Allele der Polymorphismen $\text{wt} \rightarrow \Delta 6\text{bp}$ und $68\text{C} \rightarrow \text{T}$ des $\text{TGF}\beta 3$ -Gens beobachtet werden. Keine Mutter berichtete, Medikamente, die bekannt für ihre spalteninduzierende Wirkung sind (Phenytoin, Valproinsäure, Thalidomid, hochdosierte Retinoide), während der Schwangerschaft eingenommen zu haben.

3.3.2 GS-Patienten

Eine Mutter einer GS-Patientin (Fam. 5030) gab an, während der Schwangerschaft geraucht zu haben. Das betroffene Kind zeigte phänotypisch eine komplette Gaumenspalte und wurde mit wt/wt für den Polymorphismus $\text{wt} \rightarrow \Delta 4\text{bp}$ des $\text{TGF}\alpha$ -Gens und $\text{wt} \rightarrow \Delta 6\text{bp}$ sowie 68TT der Sequenzvariante $68\text{C} \rightarrow \text{T}$ des $\text{TGF}\beta 3$ -Gens genotypisiert.

Die Mutter einer GS-Patientin (Fam. 5011) hatte einen Diabetes mellitus. Das betroffene Kind zeigte den Genotyp $\text{wt}/\Delta 4\text{bp}$. Für die untersuchten Polymorphismen des $\text{TGF}\beta 3$ -Gens wurde die Patientin mit wt/wt und 68TT genotypisiert.

3.4 Kombination der Polymorphismen im $\text{TGF}\alpha$ - und $\text{TGF}\beta 3$ -Gen

Untersucht wurde, ob die Kombination der Sequenzvarianten der Gene $\text{TGF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta 3$ einen Einfluss auf die Entwicklung einer LKGS hat.

Bei nur einem Patienten mit LK/GS (Familie 5045; Abb. 3.7) und einem Patienten mit GS (Familie 5008; Abb. 3.8) konnte das seltene Allel $\Delta 4bp$ des $TGF\alpha$ -Gens in Kombination mit dem seltenen Allel $\Delta 6bp$ des $TGF\beta 3$ -Gens beobachtet werden.

Der LK/GS-Patient wies eine einseitige LK/GS ohne familiäre Belastung auf. Das $TGF\alpha$ -Allel wurde vom Vater, das $TGF\beta 3$ -Allel von der Mutter transmittiert. Der GS-Patient (Abb. 3.8) erhielt beide Allele des nicht betroffenen Vaters. Auch hier handelt es sich um eine sporadische Fehlbildung.

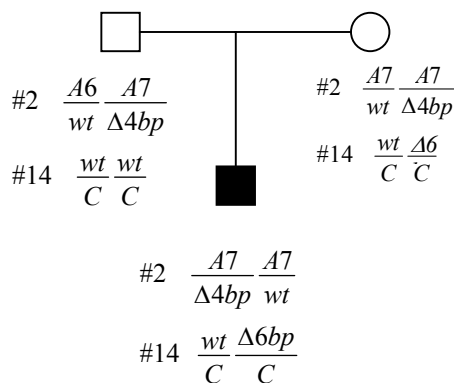


Abb. 3.7 Diese Abbildung zeigt den Stammbaum der Familie 5045 (LK/GS). Mutter und Sohn sind sowohl für den Polymorphismus $wt \rightarrow \Delta 4bp$ im $TGF\alpha$ -Gen als auch für $wt \rightarrow \Delta 6bp$ im $TGF\beta 3$ -Gen heterozygot. Der Patient weist den Phänotyp $L_0K_0G_0S_3G_3K_0L_3$ auf. In diesem Fall transmittierte die Mutter das Allel $\Delta 6bp$ und der Vater das Allel $\Delta 4bp$. Die Mutter rauchte während der Schwangerschaft.

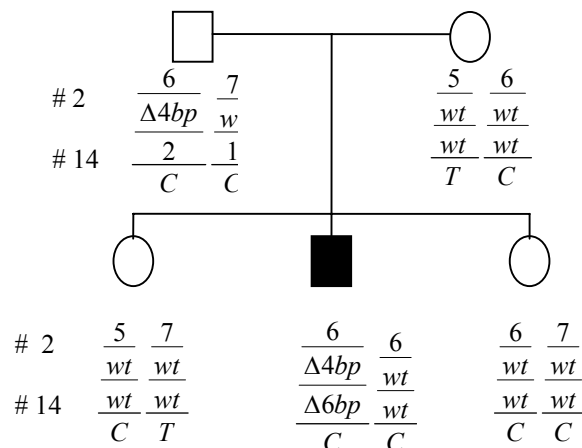


Abb. 3.8 Diese Abbildung zeigt den Stammbaum der Familie 5008 (GS). Vater und Sohn weisen jeweils die seltenen Allele $\Delta 4bp$ des Polymorphismus $wt \rightarrow \Delta 4bp$ und $\Delta 6bp$ des Polymorphismus $wt \rightarrow \Delta 6bp$ auf. Die Mutter des GS-Patienten ist heterozygot für $68C \rightarrow T$. Alle Kinder sind genotypisch verschieden.

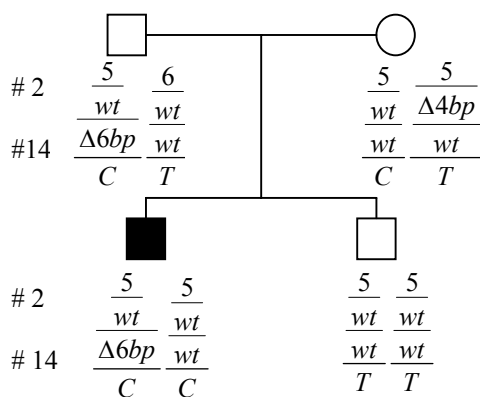


Abb. 3.9 Die Abbildung zeigt den Stammbaum der Familie 5002 (LK/GS). Die seltenen Allele der untersuchten Polymorphismen $TGF\alpha$ und $TGF\beta 3$ kommen gehäuft vor. Der Urgroßonkel väterlicherseits zeigte ebenfalls den Phänotyp einer LK/GS. Der Vater ist heterozygot für die Allele der Polymorphismen von $TGF\beta 3$ $wt \rightarrow \Delta 6bp$ und $68C \rightarrow T$. Bei der Mutter wurden das Allel $\Delta 4bp$ und $68T$ nachgewiesen. Nur der Vater transmittiert eines der seltenen Allele ($\Delta 6bp$). Die Geschwister unterscheiden sich in den Haplotypen für $TGF\beta 3$ jedoch nicht für $TGF\alpha$.

4 Diskussion

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) zählen zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Menschen. Aufgrund der embryonalen Entwicklung des menschlichen Gaumens unterscheidet man Spalten des primären und/oder des sekundären Gaumens (LK/GS) von Spalten, die ausschließlich den sekundären Gaumen (Gaumenspalten, GS) betreffen. Lippen, Kiefer und Gaumen entstehen in der 5. – 12. Woche der menschlichen Embryonalentwicklung.

Die Prävalenz der nicht syndromalen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LK/GS) liegt in der weißen Bevölkerung bei 1:1000 (Wyszynski et al. 1996). Die Prävalenz der isolierten Gaumenspalten (GS) liegt in der weißen Bevölkerung bei 1:2500 (Sadler 1998).

Das klinische Bild der LKGS kann sehr variieren. Es reicht von einer leichten Einkerbung der Lippe oder des weichen Gaumens bis hin zu einer beidseitigen Spalte. Die Beschreibung der Art und der Ausprägung der LKGS erfolgt nach dem Thallwitzer Klassifikationsschema.

Für die Ätiologie der LKGS wird eine multifaktorielle Genese verantwortlich gemacht. Erst das Zusammenspiel genetischer und exogener Faktoren (z.B. Medikamente, Ernährung, Zigarettenkonsum der Mutter) führt zur Ausbildung einer LKGS.

4.1 Die Suche nach den verantwortlichen Genen

Gene, welche aufgrund ihrer bekannten Funktion, ihres Expressionsmusters oder ihrer chromosomalen Lokalisation in Betracht gezogen werden können, Fehlbildungen der Lippe, des Kiefers und des Gaumens zu verursachen, werden als Kandidatengene bezeichnet.

Die Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor alpha (TGF α) und Transforming Growth Factor beta 3 (TGF β 3) werden als Kandidatengene betrachtet, da sie zur Zeit der Gaumenfusion verstärkt im Mittellinienepithel exprimiert werden (Ferguson et al. 1987, 1988; Dixon et al. 1991). Außerdem zeigen Mäuse, die TGF β 3 nicht exprimieren, einen der humanen GS ähnlichen Phänotyp (Kaartinen et al. 1995; Proetzel et al. 1995).

4.2 Assoziationsstudien

4.2.1 Fall-Kontroll-Assoziationsstudien

Zur Klärung, ob das Vorliegen einer Sequenzvariante in einem Kandidatengen ein Risikofaktor für die Entstehung einer Fehlbildung ist, können Fall-Kontroll-Assoziationsstudien durchgeführt werden. Derartige Studien vergleichen die Häufigkeit der Sequenzvariante bei Patienten und Kontrollpersonen. Treten die Merkmale signifikant häufiger bei Patienten mit LK/GS oder GS auf, folgert man, dass sie mit der Krankheit assoziiert sind (Kreinbrock & Schach 2000). Wichtig ist, dass die Probanden aus der gleichen Population stammen, da sich die Häufigkeiten der Sequenzvarianten verschiedener Populationen unterscheiden. Werden Patienten und Kontrollpersonen aus genetisch unterschiedlichen Populationen miteinander verglichen, so können falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse resultieren (Schaid & Sommer 1993, Lander & Schork 1994).

Die deutsche Population sollte mit einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie auf eine Assoziation von jeweils zwei Sequenzvarianten der $TGF\alpha$ -Genregion und des $TGF\beta 3$ -Gens getestet werden. Bei den Sequenzvarianten der $TGF\alpha$ -Genregion handelt es sich um eine 4 bp Deletion im Intron 5 ($wt \rightarrow \Delta 4bp$) und eine 4 bp-Wiederholung in unmittelbarer Nähe des $TGF\alpha$ -Gens (D2S443). Bei den Sequenzvarianten des $TGF\beta 3$ -Gens handelt es sich um eine 6 bp Deletion im Promotorbereich ($wt \rightarrow \Delta 6bp$) und einen Basenaustausch $C \rightarrow T$ im Intron 4 ($68C \rightarrow T$). Die Häufigkeit der mutmaßlich mit LKGS assoziierten Sequenzvariante bei Patienten wurde mit der Häufigkeit bei Kontrollpersonen verglichen. Tritt das seltene Allel der untersuchten Sequenzvariante signifikant häufiger bei Patienten als bei Kontrollpersonen auf, so ist es mit LK/GS oder GS assoziiert.

4.2.2 Familienbasierte Assoziationsstudien

Um die oben aufgezeigten Probleme der Fall-Kontroll-Assoziationsstudien zu vermeiden, die sich durch die Wahl der Kontrollgruppe ergeben, wurde zusätzlich der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT) durchgeführt. Beim TDT werden Familientrios – bestehend aus Patient/in und Eltern – untersucht. Die nicht transmittierten Allele der Eltern dienen als interne Kontrollen. Somit ist sichergestellt, dass die Probanden der gleichen Population entstammen (Spielman et al. 1993). Wird

die mutmaßlich für LKGS verantwortliche Sequenzvariante überzufällig häufig von heterozygoten Eltern an das betroffene Kind transmittiert, so liegt eine Assoziation und eine Kopplung der Sequenzvariante mit LKGS vor.

Der TDT erfordert im Vergleich zu Fall-Kontroll-Assoziationsstudien einen diagnostischen Mehraufwand von 50%, da drei Probanden (Vater, Mutter, Kind) genotypisiert werden müssen. Durch Vermeidung von Effekten der Populationsstruktur bietet er aber auch mehr Zuverlässigkeit. Der TDT eignet sich gut zur Untersuchung von LKGS, da diese Erkrankung mit der Geburt manifest ist. Bei Krankheiten, die sich erst später manifestieren, könnte es schwierig werden, genügend Patienten mit noch lebenden Eltern zu finden.

4.3 Experimentelle Methoden

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sequenzvarianten handelt es sich um bekannte Sequenzvarianten der Genregion *TGF α* und des *TGF β 3*-Gens. Zur Identifizierung der Sequenzvarianten wurde genomische Leukozyten-DNA verwendet.

Bei den Sequenzvarianten wt \rightarrow Δ 4bp des *TGF α* -Gens und wt \rightarrow Δ 6bp des *TGF β 3*-Gens handelt es sich um kleine Deletionen, die mit PCR-Amplifikation der betroffenen Region und anschließender Gelelektrophorese identifiziert werden können. Als Gelmatrix wurde ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) verwendet, dessen Porengröße je nach PCR-Produktgröße variiert werden kann. Der PAA-Anteil in der Gelmatrix ist um so geringer, je größer das PCR-Amplifikationsprodukt ist. Diese Methode ist einfach zu handhaben und eignet sich gut zur Identifikation kleiner Deletionen bis zu einer Größe von 3bp.

Die Mikrosatellitenregion D2S443 besteht aus zwölf 4 bp-Wiederholungen in der Nähe des *TGF α* -Gens. Zur Identifizierung der verschiedenen Allele können verschiedene Methoden angewendet werden. Dabei handelt es sich um die bereits vorgestellte Polyacrylamidgelelektrophorese (PAA-Gelelektrophorese), Heteroduplex-Analyse (HA) und die automatische DNA-Fragmentlängenanalyse. Die Heteroduplex-Analyse weist von der Wildtypsequenz abweichende, nicht 100% komplementär gepaarte DNA-Fragmente nach. Die veränderte Sekundärstruktur dieser Heteroduplex-Moleküle bewirkt ein unterschiedliches Migrationsverhalten während der Elektrophorese. Die Sensitivität dieser Methode beträgt 70-80% für DNA-Fragmente von einer Größe bis zu 300 bp (White et al. 1992). Diese Methode ist jedoch aufwendig zu etablieren, wenn es sich wie bei D2S443 um eine Mikrosatellitenregion handelt, da die Längenzuordnung

der 12 Allele nicht immer zuverlässig gelingt. Die 12 Allele der Mikrosatellitenregion D2S443 konnten mit der PAA-Gelelektrophorese und der HA nicht eindeutig zugeordnet werden, so dass die automatische DNA-Fragmentlängenanalyse in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Bei dieser Methode werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte PCR-Produkte durch einen Laserstrahl erfaßt und ihre Größe bestimmt. Der mit einem anderen Farbstoff markierte interne Längenstandard erlaubt eine sehr genaue Aussage bezüglich der PCR-Produktlänge. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht in den sehr hohen Anschaffungs- und Betriebskosten für das Gerät und die Computersoftware.

Der Basenaustausch 68C→T im TGFβ3-Gen wurde mit der Einzelstrang-Konformations-Analyse (Single Strand Conformational Analysis, SSCA) nachgewiesen (Orieta et al. 1989). Aufgrund der einfachen Etablierung und dennoch hohen Sensitivität wurde die SSCA für die Untersuchung der Sequenzanalyse des Basenaustausches 68C→T des TGFβ3-Gens ausgewählt.

4.4 Das Kandidatengen TGFα

Aufgrund der Expression im Gaumengewebe und der hohen Konzentration im Mittellinienepithel zur Zeit der Gaumenfusion wählten Ardinger und Mitarbeiter (1989) den Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor alpha (TGFα) als Kandidatengen für LKGS.

TGFα regt in Gewebekulturen der Maus sowohl die Proliferation des Mesenchyms als auch der extrazellulären Matrix an und verhindert die Apoptose des Mittellinienepithels (Dixon et al. 1991). Bisher stand die Entwicklung des sekundären Gaumens im Vordergrund embryologischer Studien. Dennoch ist zu vermuten, dass ähnliche Mechanismen an der Entwicklung des primären und des sekundären Gaumens beteiligt sind (Migration des Mesenchyms, Fusion der Strukturen durch Apoptose des Mittellinienepithels).

In der Literatur werden vier Polymorphismen des TGFα-Locus beschrieben, die mit LKGS assoziiert sind: 1. wt→Δ4bp, eine 4 bp Deletion im Intron 5, 2. BamHI, eine nicht näher bezeichnete Deletion, die eine Restriktionsstelle für das Enzym BamHI generiert, 3. einen nicht näher bezeichneten Basenaustausch in der nicht translatierten Region und 4. D2S443, eine Mikrosatellitenregion in der Nähe des Gens (Ardinger et al. 1989, Shiang et al. 1993, Maestri et al. 1997).

4.4.1 Der Polymorphismus wt→Δ4bp im TGFα-Gen für LKGS

Ardinger und Mitarbeiter (1989) stellten als erste eine Assoziation der Sequenzvariante Δ4bp des Polymorphismus wt→Δ4bp mit LK/GS in der kaukasischen Bevölkerung Iowas/USA fest. Sie bezeichneten das Wildtypfragment mit C1 und die Sequenzvariante mit C2. In der hier vorliegenden Arbeit wird die Sequenzvariante mit Δ4bp bezeichnet, da es sich um eine 4 bp Deletion im Intron 5 des TGFα-Gens handelt. Das Wildtypfragment wird mit wt bezeichnet.

Die von Ardinger und Mitarbeitern (1989) beschriebene Assoziation des seltenen Allels Δ4bp des Polymorphismus wt→Δ4bp mit LK/GS konnte für andere kaukasische Bevölkerungen bestätigt werden (Australien: Chevenix-Trench et al. 1991, 1992; England: Holder et al. 1992; Frankreich: Stoll et al. 1992; Pennsylvanien/USA: Sassani et al. 1993). Keine Assoziation des seltenen Allels Δ4bp mit LK/GS in der kaukasischen Bevölkerung konnten Hecht und Mitarbeiter (1991) und Lidral und Mitarbeiter (1998) feststellen. Eine 1997 von Michell angefertigte Metaanalyse über wt→Δ4bp unterstützt die Vermutung, dass TGFα an der Ätiologie der LK/GS beteiligt ist.

Bisher liegen nur zwei Assoziationsstudien zu wt→Δ4bp und Gaumenspalten (GS) vor. Shiang und Mitarbeiter (1993) beschreiben eine Assoziation des seltenen Allels Δ4bp mit GS. Lidral und Mitarbeiter (1998) konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen. In beiden Studien war die kaukasische Bevölkerung Iowas/USA Gegenstand der Untersuchungen.

4.4.1.1 Assoziationsstudien für wt→Δ4bp im TGFα-Gen bei LK/GS-Patienten

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob das seltene Allel Δ4bp des Polymorphismus wt→Δ4bp in der deutschen Bevölkerung ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer nicht syndromalen LKGS darstellt. Um dies zu überprüfen, wurden eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie und eine familienbasierte Assoziationsstudie (Transmission-Disequilibrium-Test, TDT) durchgeführt.

Zunächst wurde die Häufigkeit des seltenen Allels Δ4bp in der deutschen Bevölkerung bestimmt. Diese beträgt in der deutschen Population 0,06. In der kaukasischen Population Iowas/USA ist die Häufigkeit mit 0,10 am höchsten und in der britischen Population mit 0,04 am niedrigsten (Lidral et al. 1998, Holder et al. 1992). Die

Allelhäufigkeit in der deutschen Population liegt also im mittleren Bereich. Allelhäufigkeiten des Polymorphismus wt→ Δ 4bp verschiedener Bevölkerungsgruppen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

In der vorliegenden Studie liegt die Häufigkeit des seltenen Allels Δ 4bp bei 0,15 bei LK/GS-Patienten (Tab. 3.1). Im Vergleich mit der Allelhäufigkeit bei LK/GS-Patienten in England, Frankreich, den USA und Australien ist die Häufigkeit bei LK/GS-Patienten in Deutschland im mittleren Bereich anzusiedeln (Tab. 4.1). Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten bei LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen zeigte eine statistisch signifikante Assoziation des seltenen Allels Δ 4bp mit LK/GS (P -Wert: 0,019). Die in der vorliegenden Studie festgestellte Assoziation des seltenen Allels Δ 4bp zu LK/GS wurde durch die familienbasierte Assoziationsstudie (TDT) bestätigt (P -Wert: 0,035).

Die minimale Stichprobengröße, die zur definitiven Annahme der Richtigkeit einer Assoziation benötigt wird, liegt laut Fletcher und Kessling (1998) bei etwa 250 Kontrollpersonen und 250 Patienten. Da in der vorliegenden Studie nur 37 LK/GS-Patienten, deren Eltern sowie 111 Kontrollpersonen untersucht wurden, müssen die Ergebnisse zurückhaltend beurteilt werden. Weitere Familien werden zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe bezüglich des Polymorphismus wt→ Δ 4bp genotypisiert und mittels einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie und der familienbasierten Assoziationsstudie auf die beschriebene Assoziation und Kopplung geprüft.

Nur die Studie von Lidral und Mitarbeitern (1998), die keine Assoziation des seltenen Allels Δ 4bp mit LK/GS beschreibt, verfügt über die geforderte Stichprobengröße (364 LK/GS-Patienten; 502 Kontrollpersonen). Alle weiteren Studien in den USA, Europa und Australien mit negativer oder positiver Assoziation schließen eine geringere Stichprobengröße ein, so dass die Bewertung der Ergebnisse vorbehaltlich erfolgen muss (Tab. 4.1).

Die Metaanalyse von Michell (1997) mit 2558 Kontrollpersonen und 1573 LK/GS-Patienten bestätigt eine Assoziation des seltenen Allels Δ 4bp und LK/GS. Diese Metaanalyse erfüllt die geforderte Gruppengröße, berücksichtigt aber nicht die für Assoziationsstudien erforderliche Homogenität der untersuchten Population.

Tab. 4.1 Literaturwerte der Genotypen und Allelhäufigkeit des Polymorphismus wt→Δ4bp bei LK/GS-Patienten

Untersucht wurden die Genotypen bezüglich des Polymorphismus Δ4bp im TGFα-Gen bei LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen der Allgemeinbevölkerung. Ardinger et al. (1989), Chevenix-Trench et al. (1991) Holder et al. (1992), Sassani et al. (1993) und Mitchell et al. (1997) finden eine Assoziation zwischen LK/GS und dem Genotyp wt/Δ4bp. Lidral et al. (1998) findet keine Assoziation. Shaw et al. (1996) macht keine Angaben bezüglich einer Assoziation zur LKGS.

Population	untersuchte Personen		Genotyp		Allelfrequenz		Signifikante Assoziation		Referenz
	n	wt/wt	wt/Δ4bp	Δ4bp/Δ4bp	wt	Δ4bp	Assoziation	TDT	
Iowa/USA	Kontrollen	502			449	53 (9,8%)	nein	nein	Lidral et al. Am. J. Hum. Genet. 63; 557-568 (1998)
kaukasische Population	Patienten	364			327	37 (10%)			
kaukasische Population	Kontrollen	2558			2364 (0,92)	194 (0,08)	ja		Mitchell et al. Genet. Epidemiol. 14; 231-240 (1997)
	Patienten	1573			1347 (0,88)	176 (0,12)			
Kalifornien/USA kaukasische Population	Kontrollen	379	321	58	697 (0,92)	61 (0,08)	nein		
	Patienten	190	163	22	348 (0,92)	32 (0,08)			
hispanische Population	Kontrollen	173	164	11					Shaw et al. Am. J. Hum. Genet. 58; 551-561 (1996)
	Patienten	85	18	8					
schwarze Population	Kontrollen	20	7	2					
	Patienten	8	58	1					
andere Nationalitäten	Kontrollen	65	22	7					
	Patienten	23	269	1					
britische Population	Kontrollen		55 (92%)	5 (8%)	0,96 (115)	0,04 (5)	ja		Holder et al. J. Med. Genet. 29; 390-393 (1992)
	Patienten		36 (66%)	14 (26%)	0,79 (87)	0,21 (23)			
USA/kaukasische Population								ja	Feng et al. Am. J. Hum. Genet. 55: 932-936 (1994)
Australien/ kaukasische Population	Kontrollen	113	94	17	0,907	0,093	ja		Chevenix-Trench et al. Am. J. Hum. Genet. 51; 1377-1385 (1992)
	Patienten	117	84	30	0,846	0,154			
Pennsylvania/USA kaukasische Population	Kontrollen	84	70 (0,83)	13 (0,15)	0,911	0,189			
	Patienten	83	54 (0,65)	26 (0,31)	0,819	0,169			
asiatische Population	Kontrollen	6	4	2	0,833	0,167	ja		Sassani et al. Am. J. Hum. Genet. 45; 565-569 (1993)
	Patienten	6	4	2	0,833	0,167			
schwarze Population	Kontrollen	8	4	3	0,688	0,188			
	Patienten	11	4	5	0,636	0,318			
USA/kaukasische Population								nein	Hecht et al. Am. J. Hum. Genet. 49:682-686 (1991)
Iowa/USA kaukasische Population	Kotrollen		89	8	0,95 (186)	0,05 (10)	ja		Ardinger et al. Am. J. Hum. Genet. 45; 348-353 (1989)
	Patienten		59	17	0,865 (135)	0,135 (21)			

n = Personenanzahl; wt = Wildtyp (117 bp); Δ4bp = 4 bp Deletion (113 bp)

Nur in der genetisch sehr inhomogenen Bevölkerung der USA und Australiens liegt die Häufigkeit des seltenen Allels $\Delta 4bp$ über 0,08. In homogenen Bevölkerungsgruppen liegt die Häufigkeit unter 0,08 (Frankreich, England, Deutschland). Die Allelhäufigkeit bei LK/GS-Patienten verschiedener Populationen variiert von 0,05 in der französischen bis 0,22 in der britischen Population (Stoll et al. 1993; Holder et al. 1992). Diese Unterschiede in der Allelhäufigkeit unterstreichen die entscheidende Rolle einer geeigneten Kontrollgruppe und Patienten. Da die familienbasierte Assoziationsstudie in der vorliegenden Arbeit das Ergebnis der Fall-Kontroll-Assoziationsstudien bestätigt, kann angenommen werden, dass die Zusammensetzung der getesteten deutschen Kontrollpopulation homogen ist.

Ein weiterer Aspekt, der betrachtet werden muss, ist der Anteil der familiär gehäuft vorkommenden LK/GS in den Studien (Tab. 4.2). In der hier durchgeführten Studie betrug der Anteil familiärer LK/GS 0,24. Der Genotyp $wt/\Delta 4bp$ trat in der deutschen Bevölkerung bei familiärer LK/GS nicht verstärkt auf.

Nur Hecht und Mitarbeiter (1991), die ausschließlich Patienten mit familiärer LK/GS für $wt \rightarrow \Delta 4bp$ genotypisierten, stellten keine Assoziation des seltenen Allels $\Delta 4bp$ mit LK/GS fest. Drei Studien widersprechen diesem Ergebnis (Stoll et al. 1993; Chevenix-Trench et al. 1992; Hwang et al. 1995). Stoll und Mitarbeiter (1993) untersuchten ausschließlich sporadische Fälle von LK/GS. Eine Assoziation zwischen $\Delta 4bp$ und LK/GS lag nicht vor. Die beiden anderen Studien beobachteten eine höhere Frequenz der Genotypen $wt/\Delta 4bp$ und $\Delta 4bp/\Delta 4bp$ bei Patienten mit positiver Familienanamnese gegenüber Patienten mit negativer Familienanamnese (Chevenix-Trench et al. 1992; Hwang et al. 1995). Da Chevenix-Trench und Mitarbeiter (1992) jedoch Patienten mit LK/GS und Patienten mit GS nicht gesondert untersuchten, und Hwang und Mitarbeiter (1995) Kinder mit Fehlbildungen als Kontrollpersonen verwendeten, müssen diese Ergebnisse in Frage gestellt werden.

Die Häufung des seltenen Allels $\Delta 4bp$ bei sporadischer LK/GS in der vorliegenden Studie unterstützt die These, dass $TGF\alpha$ zwar einen modulierenden Einfluß auf die LK/GS-Entwicklung ausübt, aber nicht als Hauptrisikofaktor betrachtet werden kann.

Tabelle 4.2 Allelfrequenzen und prozentualer Anteil an Patienten mit einer familiären Häufung an LK/GS verschiedener Studien.

Studie	Allelfrequenz ($\Delta 4bp$)	prozentualer Anteil an Patienten mit positiver Familienanamnese	Assoziation ja/nein
Ardinger et al. 1989	0,14	43	ja
Chevenix-Trench et al. 1992 ¹	0,15	59	ja
Holder et al. 1992	0,22	37	ja
Sassani et al. 1993	0,17	15	ja
Stoll et al. 1993	0,05	0	nein
Hwang 1994	0,09	18	ja
Shaw et al. 1996	0,08	nicht angegeben	nein
Lidral et al. 1998	0,10	14	nein
Romitti et al. 1999	0,10	14	nein

Schwierig gestaltet sich der direkte Vergleich der Studien infolge der variablen Anteile bilateraler und unilateraler LK/GS sowie der gemeinsamen Betrachtung von LK/GS und GS (Tab. 4.3). In der vorliegenden Studie wurden 3/11 Patienten (0,27) mit einer bilateralen LK/GS mit wt/ $\Delta 4bp$ genotypisiert. Diesen Genotyp zeigten 8/26 der LK/GS-Patienten mit unilateraler LK/GS (0,31).

Zwei Studien beobachten ein häufigeres Vorkommen des seltenen Allels $\Delta 4bp$ bei Patienten mit bilateraler LK/GS als bei Patienten mit einseitiger LK/GS (Holder et al. (1992): 0,28 versus 0,17; Stoll et al. (1993): 0,07 versus 0,04). Der Genotyp $\Delta 4bp/\Delta 4bp$ soll laut Holder und Mitarbeitern (1992) ein Risikofaktor für die Ausbildung einer schweren Form der LK/GS sein. Dieser Genotyp konnte in der vorliegenden Studie nur bei einem nicht betroffenen Vater nachgewiesen werden. Es konnte nicht bestätigt werden, dass es sich bei dem Genotyp $\Delta 4bp/\Delta 4bp$ um einen Risikofaktor für eine bilaterale LK/GS handelt.

Tabelle 4.3 Allelfrequenzen und prozentualer Anteil an Patienten mit bilateraler LK/GS verschiedener Studien.

Studie	Allelfrequenz ($\Delta 4bp$)	% bilaterale LK/GS
Ardinger et al. 1989	0,14	31
Chevenix-Trench et al. 1992 ¹	0,15	20
Holder et al. 1992	0,22	29
Sassani et al. 1993	0,17	35
Stoll et al. 1993	0,05	30
Hwang 1994	0,09	nicht angegeben
Shaw et al. 1996	0,08	nicht angegeben
Lidral et al. 1998	0,10	nicht angegeben
Romitti et al. 1999	0,10	nicht angegeben

¹ Patienten mit LK/GS und Gaumenspalten wurden gemeinsam untersucht

Ein weiterer Faktor, der bei der Betrachtung der Heterogenität der Studienergebnisse nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Beeinflussung der LK/GS-Entwicklung durch Umweltfaktoren und Medikamente. Aus diesem Grund wurde erfragt, welche Medikamente während der Schwangerschaft eingenommen wurden und ob die Mütter während der Schwangerschaft rauchten. Nur zwei Mütter von LK/GS-Patienten rauchten während der Schwangerschaft. Beide Patienten wurden mit wt/wt genotypisiert. Diese Fallzahl ist zu gering, um eine Aussage über die Beeinflussung der LK/GS durch Zigarettenrauchen in der frühen Schwangerschaft zu treffen.

Bisher untersuchten zwei Studien den Zusammenhang des Rauchens in der frühen Schwangerschaft, des seltenen Allels $\Delta 4\text{bp}$ und LK/GS (Shaw et al. 1996; Romitti et al. 1999). Das Risiko für die LK/GS-Entstehung erhöht sich mit steigender Zahl der gerauchten Zigaretten pro Tag. Eine Assoziation des Allels $\Delta 4\text{bp}$ mit LK/GS konnte beobachtet werden, wenn die Mütter mehr als 20 Zigaretten am Tag rauchten (Shaw et al. 1996). Romitti und Mitarbeiter (1999) konnte hingegen keine Risikoerhöhung feststellen, wenn das Allel $\Delta 4\text{bp}$ vorlag.

Auf welche Art und Weise $\text{TGF}\alpha$ mit dem Rauchen interagiert ist unbekannt. Bisher weiß man aus Tierversuchen, dass die Inhaltsstoffe Kohlenmonoxid und Nikotin in Geweben zu einer Hypoxie führen und durch diese Hypoxie eine LKGS induziert werden kann (Bronsky et al. 1986). Außerdem können Kadmium, N-nitroso- und polyzyklische aromatische Kohlenstoffverbindungen (z.B. Benzapyrene), die ebenfalls im Zigarettenrauch nachgewiesen werden können, teratogene Effekte ausüben. Eine andere Überlegung ist, dass Rauchen den Folsäurespiegel im Serum vermindert. Folsäureeinnahme führt zu einer Risikoreduktion für LKGS (Tolarova 1982). Ob die tierexperimentellen Ergebnisse ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können, müssen weitere Studien zeigen, die den Zusammenhang von Rauchen und LK/GS untersuchen.

4.4.1.2 Assoziationsstudien für wt $\rightarrow\Delta 4\text{bp}$ im $\text{TGF}\alpha$ -Gen bei GS-Patienten

Untersucht wurden in der vorliegenden Studie zehn Patienten mit Gaumenspalte (GS). Als statistische Tests wurden eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudien und eine familienbasierte Assoziationsstudie (TDT) durchgeführt. Die Allelhäufigkeit liegt bei Kontrollpersonen bei 0,06 und bei GS-Patienten bei 0,15. Das seltene Allel $\Delta 4\text{bp}$ ist in der deutschen Population nicht mit GS assoziiert (P -Wert: 0,15). Für die

familienbasierte Assoziationsstudie wurde aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Auswertung vorgenommen.

Da die vorliegende Studie nur 10 GS-Familiendios (30 Probanden) für den Polymorphismus wt→ Δ 4bp testete, müssen weitere GS-Patienten und Familiendios in der deutschen Population genotypisiert werden, um die statistische Aussagekraft zu verbessern.

Zwei Studien bestätigen das Ergebnis der vorliegenden Studie (Lidral et al. 1998; Romitti et al. 1999). Im Gegensatz dazu beschreiben sowohl Shiang und Mitarbeiter (1993) als auch Shaw und Mitarbeiter (1996) eine Assoziation des seltenen Allels Δ 4bp mit GS (Shiang et al. 1993 (Δ 4bp Frequenz: 0,25; $P = 0,003$; $p \leq 0,05$). Shaw und Mitarbeiter (1996) stellen jedoch nur eine signifikante Assoziation des Allels Δ 4bp mit GS in Zusammenhang mit mütterlichem Zigarettenkonsum in der frühen Schwangerschaft von mehr als 20 Zigaretten pro Tag fest (OR = 9,0 für den Genotyp wt/ Δ 4bp oder Δ 4bp/ Δ 4bp versus OR = 1,8 für den Genotyp wt/wt).

4.4.1.3 Die Rolle der Mutter

In der vorliegenden Studie wurde auch untersucht, ob der Genotyp der Mutter ein Risikofaktor für die Entwicklung einer LKGS beim Kind sein könnte. Das seltene Allel Δ 4bp ist weder bei Müttern von LK/GS- (P -Wert: 0,3) noch bei Müttern von GS-Patienten (P -Wert: 0,3) mit LKGS des Kindes assoziiert (Tab. 3.1 und 3.2). Bisher liegen keine weiteren Veröffentlichungen über eine mögliche Assoziation des mütterlichen Genotyps mit dem Phänotyp des Kindes vor. Man könnte sich jedoch vorstellen, dass TGF α , ein kleines aus nur 50 Aminosäuren bestehendes Protein, diaplazentar in den kindlichen Kreislauf übertreten kann. Ähnliches ist über TGF β 1 bekannt (Letterio et al. 1994). Ein erniedrigter TGF α -Spiegel im Blut der Mutter könnte so einen Einfluß auf die Entwicklung des Embryos haben. Bisher ist jedoch nur bekannt, dass TGF α in der Dezidua gebildet wird (Han et al. 1987). Ob TGF α tatsächlich in den Kreislauf des Embryos übertritt, ist unbekannt. Weitere Studien sind nötig, um die Wirkungsweise von TGF α aufzuklären.

Tab. 4.4 Literaturwerte des Polymorphismus wt→Δ4bp: Genotypen und Allelfrequenzen bei GS-Patienten

Untersucht wurden die Genotypen bezüglich des Polymorphismus Δ4bp im TGFα-Gen bei GS-Patienten und Kontrollpersonen der Allgemeinbevölkerung.

Population	untersuchte Personen	n	Genotyp			Allelfrequenz		Signifikante Assoziation		Referenz
			wt/wt	wt/Δ4bp	Δ4bp/Δ4bp	wt	Δ4bp	Assoziation	TDT	
Iowa/USA	Kontrollen	502				449	53 (0,098)	nein	nein	Lidral et al. Am. J. Hum. Genet. 63; 557-568 (1998)
Kaukasische Population	Patienten	124				109	15 (0,126)			
Kalifornien/USA Kaukasische Population	Kontrollen	379	321	58				ja	Shaw et al. Am. J. Hum. Genet. 58; 551-561 (1996)	
	Patienten		68	18	1					
Hispanische Population	Kontrollen	173	164		11					
	Patienten		23		1					
Schwarze Population	Kontrollen	20	18		2					
	Patienten		3		1					
andere	Kontrollen	65	58		7					
	Patienten		8		2					
gesamt		125	102		23					
Iowa/USA	Kontrollen	170				311	29			Shiang et al. Am. J. Hum. Genet. 53; 836-843 (1993)
	Patienten	43				69	17			

Tab. 4.5 Literaturwerte über Allelfrequenzen von D2S443 bei LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen

Untersucht wurde eine Mikrosatellitenregion in der Nähe des TGFα-Gens. Dargestellt sind die Allelfrequenzen der 12 Allele bei LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen der Allgemeinbevölkerung.

Population	untersuchte Personen	n	Allelfrequenz												Signifikante Assoziation		Referenz
			A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	Assoziation	TDT	
USA (Iowa)	Kontrollen	1	26	8	37	114	114	65	19	18	12	3	0		nein	nein	Lidral et al. (1998) Am.J. Hum.Genet. 163; 557-568
	Patienten	3	25	18	43	103	97	53	18	11	6	0	0				
USA Mexiko															nein	nein	Wyszynski et al. (1996)
															nein	nein	Hum.Hered. 47; 101-109
USA		66				11									ja	ja	Maestri et al. (1997) Am.J. Med.Genet. 73; 337-344
															(Allel 4)		

Tab. 4.6 Literaturwerte über Allelfrequenzen von D2S443 bei GS-Patienten und Kontrollpersonen

Untersucht wurde eine Mikrosatellitenregion in der Nähe des TGFα-Gens. Dargestellt sind die Allelfrequenzen der 12 Allele bei GS-Patienten und Kontrollpersonen der Allgemeinbevölkerung.

Population	untersuchte Personen	n	Allelfrequenz												Signifikante Assoziation		Referenz
			A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	Assoziation	TDT	
USA (Iowa)	Kontrollen	1	26	8	37	114	114	65	19	18	12	3			nein	nein	Lidral et al. (1998) Am.J. Hum.Genet. 163; 557-568
	Patienten	0	8	2	6	35	32	12	9	4	4	1					
USA		47				10									nein	nein	Maestri et al. (1997) Am.J. Med.Genet. 73; 337-344
															(Allel 4)		

4.4.2 Genlocus TGF α und D2S443

Bei der Mikrosatellitenregion D2S443 handelt es sich um eine repetitive Tetranukleotidsequenz, die auf demselben künstlichen Hefechromosom wie TGF α lokalisiert ist. Für D2S443 werden zwölf Allele unterschieden. Bisher untersuchten nur drei amerikanische Studien diese Mikrosatellitenregion auf eine Assoziation mit LKGS (Tab. 4.5 und 4.6). Maestri und Mitarbeiter (1997) beobachteten eine verstärkte Transmission des Allels A4 bei LK/GS-Patienten. Wyszynski und Mitarbeiter (1997) stellten eine häufigere Transmission von Allel A8 bei LK/GS-Patienten fest. Beide Studien konnten jedoch keine statistische Signifikanz beschreiben. Lidral und Mitarbeiter (1998) konnten keine Assoziation mit LKGS feststellen.

4.4.2.1 Assoziationsstudien für D2S443 bei LK/GS- und GS-Patienten

Um die deutsche Population auf eine Assoziation der Allele der Mikrosatellitenregion D2S443 mit LKGS zu prüfen, wurden sowohl eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie als auch eine familienbasierte Assoziationsstudie (TDT) durchgeführt. Zunächst wurden die Allelfrequenzen in der deutschen Population ermittelt (Tabelle 3.6). Die Allele A5-A8 kamen am häufigsten vor (A5-A8: 0,79). Zwei Studien stellten ebenfalls eine Häufung der Allele A5-A7 fest (Wyszynski et al. 1997; Lidral et al. 1998). Allel A8 wurde seltener in der Population Iowas/USA als in der deutschen Bevölkerung beobachtet (Tab. 4.5 und 4.6; Lidral et al. 1998).

Die Allelhäufigkeiten der Mikrosatellitenregion D2S443 bei Patienten mit LK/GS und GS unterschieden sich nicht von den Allelhäufigkeiten in der deutschen Population. Die Allele A5-A8 traten bevorzugt auf (LK/GS: 0,74; GS: 0,75). Bei LK/GS-Patienten wurde das Allel A5 häufiger beobachtet als bei Kontrollpersonen, ist aber nicht statistisch signifikant (P -Wert: 0,183). Allel A6 wurde mit einer geringeren Häufigkeit ohne statistische Signifikanz nachgewiesen (P -Wert: 0,93).

Um Effekte der Populationsstruktur zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studien neben der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie eine familienbasierte Assoziationsstudie (TDT) angewendet. Die Allele A4 (2/5) und A8 (5/16) wurden bei LK/GS-Familientrios nicht bevorzugt transmittiert. Bei den übrigen Allelen war keine eindeutige Tendenz zu beobachten (A5: 10/17, P -Wert: 0,203; A7: 19/35, P -Wert: 0,246; Tab. 3.5).

Allel A6 wurde bei GS-Familientrios fast immer transmittiert (8/10; Tab. 3.8). Allel A5 wurde nur einmal von heterozygoten Eltern transmittiert (1/5). Aufgrund der geringen Patientenanzahl wurde keine statistische Berechnung vorgenommen.

Da die Anzahl der untersuchten LKGS-Patienten und Familientrios zu gering ist, um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können, müssen weitere Patienten und Familientrios für D2S443 genotypisiert werden (Fletcher & Kessling 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit den Ergebnissen von Wyszynski (1997) und Lidral und Mitarbeitern (1998) überein, die ebenfalls keine signifikante Assoziation und Kopplung eines der Allele der Mikrosatellitenregion D2S443 mit LK/GS beschreiben. Wyszynski und Mitarbeiter (1997) konnten eine bevorzugte Transmission des Allels A8 feststellen, jedoch ohne statistische Signifikanz (6/6). In der hier vorliegenden Studie wurde Allel A8 seltener transmittiert (5/16). Maestri und Mitarbeiter (1997) konnten eine verstärkte Transmission des Allels A4 bei Patienten mit kompletter LK/GS beobachten (11/13). Dieses Ergebnis war nicht mehr statistisch signifikant, wenn Patienten mit Lippenspalte und kompletter LK/GS gemeinsam getestet wurden (15/25). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, da Allel A4 nicht bevorzugt transmittiert wurde (3/9).

Nur zwei Studien untersuchten die Allele des Polymorphismus D2S443 auf eine Assoziation und Kopplung mit GS (Maestri et al. 1997; Lidral et al. 1998). Beide Studien beschreiben weder eine Assoziation noch eine Kopplung eines der Allele der Mikrosatellitenregion D2S443 mit GS (Tab. 4.6).

Die sich widersprechenden Resultate können folgende Ursachen haben:

1. Eine Schwierigkeit im Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den anderen Studien besteht in der Tatsache, dass die vorangegangenen Studien nicht die Fragmentlänge sondern nur die Benennung der Allele A1 – A12 der Mikrosatellitenregion D2S443 angeben. Auch Angaben der GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov und www.chlc.org) lieferten keinen Hinweis auf die offizielle Benennung der DNA-Fragmente. Die Benennung der Allele in der vorliegenden Studie könnte also nach einem anderen Schema erfolgt sein. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Allele A5-A7 in den getesteten Populationen vergleichbare Frequenzen aufweisen und in der deutschen Population ebenfalls 12 Allele nachgewiesen werden konnten. Wäre dies dennoch der Fall, so könnte eine Verschiebung der Allelbenennung um eine Tetranukleotidsequenz zu einem größeren oder kleineren Allel eine Assoziation und Kopplung bestätigen. Dies ist nicht der Fall.
2. Der Anteil an Patienten mit familiärer und sporadischer LK/GS ist in den Studien unterschiedlich. Wyszynsky und Mitarbeiter (1997) untersuchten ausschließlich LK/GS-Patienten mit positiver Familienanamnese. Maestri und Mitarbeiter (1997)

hatten einen Anteil von 49% familiärer LK/GS-Fälle. Diese Studie beschreibt jedoch eine verstärkte Transmission des Allels A4 bei sporadisch vorkommender LK/GS. Die Ergebnisse von Lidral und Mitarbeitern (1998) und der hier vorliegenden Studie mit nur einem geringen Anteil familiärer Fälle (14,3% und 24,3%) bestätigen dies nicht.

4.5 Das Kandidatengen TGFβ3

Aufgrund der Expression im Gaumengewebe zur Zeit der Gaumenfusion wird angenommen, dass der Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor beta 3 (TGFβ3) an der Ätiologie der LKGS beteiligt ist.

Hinweise auf seine spezifische Funktion liefern sowohl Expressionsstudien an Mäusegaumen und Studien an TGFβ3-Knockout Mäusen als auch die fehlende Fusion der Gaumenfortsätze durch Hemmung der TGFβ3-Aktivität (Fitzpatrick et al. 1990; Proetzel et al. 1995; Kaartinen et al. 1995; Brunet et al. 1995; Taya et al. 1999). Auch wird durch Zugabe von humanen TGFβ3 die Gaumenfusion in Hühnerembryonen induziert (Sun et al. 1998).

In der Literatur werden zwei Polymorphismen des TGFβ3-Gens beschrieben, die mit LKGS assoziiert sind. Bei diesen Polymorphismen handelt es sich um eine 6 bp Deletion in der Promotorregion (wt→Δ6bp) und den Basenaustausch 68C→T im Intron 4 des TGFβ3-Gens (Lidral et al. 1997, 1998; Romitti et al. 1999; Maestri et al. 1997).

4.5.1 Assoziationsstudien für wt→Δ6bp im TGFβ3-Gen bei LK/GS- und GS-Patienten

Lidral und Mitarbeiter (1998) beschrieben als erste eine Assoziation des seltenen Allels Δ6bp des Polymorphismus wt→Δ6bp mit LK/GS in der kaukasischen Bevölkerung Iowas/USA. In der Literatur wird dieser Polymorphismus mit 5'UTR.1 bezeichnet. Es handelt sich um eine 6 bp Deletion in der Promotorregion von *TGFβ3*. Eine weitere Studie untersuchte diesen Polymorphismus in Bezug auf eine eventuelle Risikoerhöhung bei mütterlichem Rauchen und Alkoholkonsum während der Schwangerschaft (Romitti et al. 1999). Hier konnte ein erhöhtes Risiko für Kinder mit dem häufigen Genotyp wt/wt beobachtet werden. Weitere Untersuchungen dieses Polymorphismus liegen nicht vor.

In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob das seltene Allel Δ6bp in der deutschen Bevölkerung ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer nicht syndromalen

LK/GS darstellt. Es wurden eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie und eine familienbasierte Assoziationsstudie (TDT) durchgeführt. Zunächst wurde die Allelhäufigkeit des seltenen Allels $\Delta 6bp$ in der deutschen Population bestimmt. Diese beträgt in der deutschen Bevölkerung 0,04. Die Häufigkeit des seltenen Allels $\Delta 6bp$ beträgt in der Bevölkerung Iowas/USA 0,06 (Lidral et al. 1998). In der deutschen Population liegt die Häufigkeit somit etwas niedriger als in der US-amerikanischen Bevölkerung (0,06).

Die Häufigkeit des seltenen Allels $\Delta 6bp$ liegt in der deutschen Bevölkerung bei LK/GS-Patienten bei 0,04 und bei GS-Patienten bei 0,05. Der Vergleich der Genotyphäufigkeiten bei LK/GS-Patienten und Kontrollpersonen zeigte keine statistische Signifikanz (LK/GS: *P*-Wert: 0,94; GS: *P*-Wert: 0,87). Es besteht keine Assoziation zwischen dem seltenen Allel $\Delta 6bp$ und LKGS. Die familienbasierte Assoziationsstudie bestätigt die Resultate der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie (LK/GS: *P*-Wert: 0,66; Tab. 3.11 und 3.12). Die familienbasierte Assoziationsstudie wurde für GS aufgrund der geringen Patientenzahl nicht durchgeführt. Um eine Assoziation des seltenen Allels $\Delta 6bp$ mit LK/GS und GS definitiv ausschließen zu können, umfaßt die Stichprobengröße der vorliegenden Studie eine zu geringe Patientenzahl (Fletcher & Kessling 1998). Weitere Familien müssen also für den Polymorphismus $wt \rightarrow \Delta 6bp$ genotypisiert werden, um die Stichprobengröße und damit die Sicherheit der statistischen Ergebnisse zu erhöhen.

Bisher sind nur zwei weitere Fall-Kontroll-Assoziationsstudien durchgeführt worden, welche auf eine Assoziation des seltenen Allels $\Delta 6bp$ testeten (Lidral et al. 1998; Romitti et al. 1999). Auch diese Studien konnten keine Assoziation des seltenen Allels $\Delta 6bp$ mit LKGS feststellen. Romitti und Mitarbeiter (1999) beobachteten ein erhöhtes Risiko für den homozygoten Genotyp wt/wt für LK/GS und GS, wenn Mütter während der frühen Schwangerschaft täglich mehr als zehn Zigaretten rauchten. Dieses konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, da nur zwei der Mütter angaben, während der Schwangerschaft geraucht zu haben. Beide betroffenen Kinder zeigten den Genotyp wt/wt .

Die vorliegende Studie bestätigt die Ergebnisse der Fall-Kontroll-Assoziationsstudien von Lidral und Mitarbeitern (1998) und Romitti und Mitarbeitern (1999). Die Sequenzvariante $\Delta 6bp$ erhöht das Risiko für die Entwicklung einer LK/GS oder GS nicht.

4.5.2 Assoziationsstudien für 68C→T im TGFβ3-Gen bei LK/GS- und GS-Patienten

Eine weitere Sequenzvariante des TGFβ3-Gens, die an der Ätiologie der LKGS von Bedeutung sein soll, beschreiben Lidral und Mitarbeiter (1998). Es handelt sich um einen Basenaustausch C → T an Stelle 68 im Intron 4 von *TGFβ3* (Lidral et al. 1998). Lidral und Mitarbeiter (1998) beschreiben eine Assoziation und Kopplung des seltenen Allels T mit LK/GS in der familienbasierten Assoziationsstudie (TDT). Untersucht wurde diese Sequenzvariante auch in Bezug auf ein eventuell erhöhtes Risiko durch Rauchen der Mutter in der frühen Schwangerschaft (Romitti et al. 1999). Das Risiko für Kinder mit dem üblichen Genotyp C/C war erhöht.

In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob das seltene Allel T an der Genese von LK/GS und GS in der deutschen Population beteiligt ist. Um auf eine Assoziation zu prüfen, wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie und eine familienbasierte Assoziationsstudie (TDT) durchgeführt. Zunächst wurde die Häufigkeit des seltenen Allels T in der deutschen Bevölkerung ermittelt. Sie liegt mit 0,06 genauso hoch wie in der Bevölkerung Iowas/USA (Tabelle 4.9 und 4.10).

Keiner der LK/GS-Patienten und nur zwei der GS-Patienten (*P-Wert*: 0,44) zeigten den Genotyp C/T oder T/T. Es besteht keine Assoziation oder Kopplung zwischen dem seltenen Allel T und LK/GS oder GS. Da in der vorliegenden Studie nur 37 LK/GS-Patienten und 10 GS-Patienten untersucht wurden, kann laut Fletcher und Kessling (1998) eine Assoziation des Allels 68T nicht ausgeschlossen werden.

Die vorliegende Arbeit bestätigt das Ergebnis der Studie von Lidral und Mitarbeitern (1998). Romitti und Mitarbeiter (1999) beschreiben sogar ein erhöhtes Risiko für LK/GS und dem gewöhnlichen Genotyp C/C, wenn die Mütter der Patienten während der Schwangerschaft rauchten. Das konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden, doch ist auffällig, dass alle LK/GS-Patienten den Genotyp C/C zeigten.

Tab. 4.7 Literaturwerte der Genotypen, Allelfrequenzen und Assoziationen des Polymorphismus wt→Δ6bp bei LK/GS-Patienten

Population	untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz		Signifikante Assoziation		Referenz
		n	wt/wt	wt/Δ6bp	Δ6bp/Δ6bp	wt	Δ6bp	Assoziation	TDT	
Iowa/USA	Kontrollen					453	29	nein	ja	Lidral et al. Am. J. Hum. Genet. 63; 557-568 (1998)
	Patienten					337	17			
Iowa/USA	Kontrollen	296	262	34				nein		Romitti et al. Teratology 53; 39-50 (1999)
	Patienten	111	97	14						

Tab. 4.8 Literaturwerte Genotypen, Allelfrequenzen und Assoziationen des Polymorphismus wt→Δ6bp bei GS-Patienten

Population	untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz		Signifikante Assoziation		Referenz
	n		wt/wt	wt/Δ6bp	Δ6bp/Δ6bp	wt	Δ6bp	Assoziation	TDT	
Iowa/USA	Kontrollen					453	29	nein	nein	Lidral et al. Am. J. Hum. Genet. 63; 557-568 (1998)
	Patienten					98	8			
Iowa/USA	Kontrollen	296	262	34				nein		Romitti et al. Teratology 53; 39-50 (1999)
	Patienten	43	37	6						

Tab. 4.9 Literaturwerte der Genotypen, Allelfrequenzen und Assoziationen des Polymorphismus 68C→T bei LK/GS-Patienten

Population	untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz		Signifikante Assoziation		Referenz
	n		CC	CT	TT	C	T	Assoziation	TDT	
Iowa/USA	Kontrollen					122	8	nein	ja	Lidral et al. Am. J. Hum. Genet. 63; 557-568 (1998)
	Patienten					156	8			
Iowa/USA	Kontrollen	253	220	33						Romitti et al. Teratology 53; 39-50 (1999)
	Patienten	110	101	9						

Tab. 4.10 Literaturwerte der Genotypen, Allelfrequenzen und Assoziationen des Polymorphismus 68C→T bei GS-Patienten

Population	untersuchte Personen		Genotyp			Allelfrequenz		Signifikante Assoziation		Referenz
	n		CC	CT	TT	C	T	Assoziation	TDT	
Iowa/USA	Kontrollen					122	8	nein	nein	Lidral et al. Am. J. Hum. Genet. 63; 557-568 (1998)
	Patienten					66	4			
Iowa/USA	Kontrollen	253	220	33						Romitti et al. Teratology 53; 39-50 (1999)
	Patienten	42	36	6						

Inwieweit der Basenaustausch C → T im Intronbereich einen Einfluß auf die Funktion des Wachstumsfaktors hat und zur Entstehung der LKGS beiträgt ist unbekannt. Da das seltene Allel T des Polymorphismus 68C→T nur bei gesunden Personen und 2/10 GS-Patienten beobachtet werden konnte, ist auszuschließen, dass es sich um einen bedeutenden Faktor bei der Entstehung der LKGS handelt.

4.5.3 Die Rolle der Mutter

Studien an Mäusen konnten zeigen, dass Tgfβ1 über die Plazenta in den kindlichen Blutkreislauf übertreten kann und den Phänotyp von Tgfβ1-Knockout-Mausembryos verhindern kann (Letterio et al. 1994). Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass auch TGFβ3, welches eine Homologie von 80% zu TGFβ1 aufweist, aus dem mütterlichen Kreislauf diaplazentar in den Kreislauf des Kindes gelangen und so dessen Entwicklung beeinflussen kann (Derynck et al. 1988). Handelt es sich bei TGFβ3 tatsächlich um einen Risikofaktor für die Entwicklung von LKGS beim Menschen, so könnte möglicherweise die intravenöse Gabe von rekombinanten TGFβ3 während der Schwangerschaft den Phänotyp verhindern. Der Einfluß von exogenem TGFβ3 ist bisher nur in Experimenten an Gaumenfortsatzkulturen von Hühnern und Mäusen untersucht worden (Sun et al. 1998; Taya et al. 1999). Es ist nicht bekannt, ob TGFβ3 tatsächlich plazentagängig ist. Der fehlende Einfluß des mütterlichen TGFβ3-Status bei Mäusen auf die kindliche Gaumenentwicklung ist auf das geringe Vorkommen an TGFβ3 im Blut zurückzuführen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in dieser Studie der Einfluß des mütterlichen Genotyps auf die Entwicklung einer LKGS untersucht. Weder eine Assoziation des seltenen Allels Δ6bp mit LK/GS noch mit GS konnte festgestellt werden. Eine signifikante Assoziation wurde nur zwischen dem seltenen Allel T des Polymorphismus 68C→T und GS beobachtet (P -Wert = 0,004). Die Kinder dieser heterozygoten Mütter ($n = 10$) waren jedoch für das häufige Allel C homozygot. Die Kinder waren somit nicht auf einen ausreichenden TGFβ3-Spiegel der Mutter angewiesen.

Ein weiterer Aspekt ist die plazentare Expression von TGFβ3 in der frühen Schwangerschaft. Diese ist zu Beginn der Schwangerschaft hoch und fällt in der neunten Gestationswoche ab (Canigga et al. 1999). Aus dieser Tatsache kann man schließen, dass durch eine Fehlfunktion des TGFβ3-Gens der Mutter die

Sauerstoffversorgung des Embryos gerade in der sensiblen Phase der Gaumenentwicklung (5. – 12. Schwangerschaftswoche) nicht ausreichend sein könnte. Sauerstoffmangel induziert im Tierexperiment Gaumenspalten und andere Mißbildungen (Bronsky et al. 1986; Astrup et al. 1972). Da in der vorliegenden Studie jedoch nur zehn Mütter von GS-Patienten zur Genotypisierung zur Verfügung standen, müssen weitere Studien folgen, um die Assoziation des seltenen Allels T des Polymorphismus 68C→T bei Müttern mit GS des Kindes zu bestätigen.

4.6 Gemeinsame Betrachtung der Polymorphismen der Gene *TGF α* und *TGF β 3*

Da man annimmt, dass es sich bei der Entstehung der LKGS um ein multifaktorielles Geschehen handelt, wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob die Kombination der Sequenzvarianten der Gene *TGF α* und *TGF β 3* zum Phänotyp einer LKGS bzw. zu einer schwereren Ausprägung führt. Bei nur einem der LK/GS- und einem GS-Patienten wurde jeweils das seltene Allel Δ 4bp des *TGF α* -Gens und Δ 6bp des *TGF β 3*-Gens beobachtet.

Der LK/GS-Patient zeigte eine einseitige LK/GS (Fam-Nr. 5045; Abb. 3.7). Die Mutter des Patienten hatte den gleichen Genotyp jedoch ohne Fehlbildung. Die Kombination der Sequenzvarianten scheint in diesem Fall nicht der alleinige Grund für die Ausbildung einer LK/GS zu sein. In dem beschriebenen Fall rauchte die Mutter während der frühen Schwangerschaft und nahm Folsäure ein. Folsäure senkt das Risiko, Zigarettenrauchen hingegen erhöht das Risiko der LKGS-Entstehung (Tolarova et al. 1982; Shaw et al. 1996, Romitti et al. 1999). In der überwiegenden Anzahl wird Folsäure erst substituiert, wenn die Schwangerschaft bekannt ist. Dies ist in der Regel frühestens in der 5. – 6. Schwangerschaftswoche möglich, so dass eine Folsäuresubstitution meist erst nach Beginn der Lippen-, Kiefer- und Gaumenentwicklung beginnt. Im beschriebenen Fall kann also die Kombination aus Zigarettenrauchen, dem seltenen Allels Δ 4bp des *TGF α* -Gens und Δ 6bp des *TGF β 3*-Gens die LK/GS induziert haben.

Der GS-Patient (Fam.-Nr. 5008; Abb. 3.8) zeigte eine beidseitige Gaumenspalte. Der Vater des Patienten zeigte bei gleichem Genotyp keine Fehlbildung des Gaumens. Wichtig bei der Entstehung dieser Gaumenspalte könnte sein, dass die Mutter das seltene Allel T des Polymorphismus 68C→T aufwies. Dieses ist bei Müttern mit GS des

Kindes assoziiert. Die beiden gesunden Schwestern des Patienten zeigten einen anderen Genotyp. In diesem Fall könnte vielleicht der Genotyp der Mutter in Kombination mit dem Genotyp des Kindes (wt/ Δ 4bp des TGF α -Gens) die Gaumenspalte prädisponiert haben.

Generell kann aber nicht behauptet werden, dass das Vorliegen mehrerer in der vorliegenden Studie untersuchten Sequenzvarianten der Gene TGF α und TGF β 3 allein zur Bildung einer LKGS oder zu einer schwereren Ausprägung führen. Am Beispiel der oben beschriebenen Fälle ist ersichtlich, dass Umwelteinflüsse und/oder mütterliche Faktoren ebenfalls von Bedeutung sind. Es ist nicht auszuschließen, dass die Sequenzvariante Δ 6bp, deren Assoziation zur LKGS nicht bestätigt werden konnte, keine Rolle spielt und die Kombination aus mütterlichem Genotyp (68C \rightarrow T) und kindlichen Genotyp (wt \rightarrow Δ 4bp) entscheidend ist. Da nur bei zwei Patienten eine Kombination der Sequenzvarianten Δ 4bp und Δ 6bp und bei nur drei Patienten die Kombination des Allels Δ 4bp beim Kind und des Allels T des Polymorphismus 68C \rightarrow T bei der Mutter beobachtet werden konnte, ist auszuschließen, dass es sich um eine häufige Ursache handelt. Weitere Faktoren sind wahrscheinlich an der Entstehung der LKGS beteiligt. Außerdem muß untersucht werden, wie diese spezifische Genotypkombinationen in der Allgemeinbevölkerung verteilt sind, um zu einer Aussage zu kommen.

4.7 Ausblick

Über die genetischen Ursachen der LK/GS und GS ist trotz ihrer hohen Prävalenz und vieler Studien wenig bekannt. Gründe sind die komplexen Vererbungsmechanismen und ein Mangel an informativen Familien. Eine alternative Möglichkeit zu klassischen Kopplungsanalysen bietet die Kandidatengensuche an Mausmodellen, die einen ähnlichen Phänotyp bieten und Expressionsstudien an Gaumenfortsatzkulturen. Bisher sind zehn Gene bei Mäusen, Hühnern und Alligatoren bekannt, die an der Regulation der Gaumenentwicklung beteiligt und für die Entstehung einer LKGS von Bedeutung sind (Tab. 4.11). Bei sechs dieser Gene sind Sequenzvarianten bekannt, welche mit LKGS beim Menschen assoziiert bzw. gekoppelt sind. Diese Assoziationen wurden teilweise in anderen Studien nicht bestätigt, so dass eine sehr heterogene Ätiologie der LKGS vermutet wird.

Fraglich ist auch, inwieweit Ergebnisse von Expressionsstudien, die an Maus-, Hühner- und Alligatorgewebe und Studien an knockout- sowie knockin- Mausmodellen, widerspruchsfrei auf den Menschen übertragen werden können.

Tab. 4.11 Kandidatengene für LK/GS und GS.

Dargestellt sind die Funktion des Gens, das untersuchte Mausmodell sowie die Studienergebnisse der homologen Gene beim Menschen.

Gen/Lokus	Funktion	Mausmodell	Mensch	Referenz
TGF α /2p13	Wachstumsfaktor		Assoziation; TDT	Ardinger et al. (1989); Michell (1997); Lidral et al. (1998)
END1	Signalfaktor	Knockout, Expression	Kopplung	Kurihara et al. (1994)
RARA/17q21	Signalfaktor	Transgen/Expression	Assoziation, TDT, Kopplung	Chevenix-Trench et al. (1992); Vitiner et al. (1993); Shaw et al. (1993); Michell et al. (1994)
TGF β /14q24	Wachstumsfaktor	Knockout, Expression	Assoziation, TDT	Lidral et al. (1998); Maestri et al. (1997); Tanabe et al. (2000)
SKI	Wachstumsfaktor	Knockout, Expression		Berk et al. (1997)
MSX1/4p16	Homeoboxgen	Knock-out, Expression	Assoziation, TDT	Lidral et al. (1998);
DLX1/2 /2q32	Homeoboxgen	Expression		Qiu et al. (1997)
PITX2	Homeoboxgen	Knock-out, Expression		Semina et al. (1996)
PAX9	Homeoboxgen	Knock-out, Expression		Peters et al. (1998)
AP2/6p24	Transkriptionsfaktor	Knockout	Kopplung	Nottoli et al. (1998)

Die untersuchten Patientenkollektive sind international in ihrer Zusammensetzung zu heterogen. Diese Patientenkollektive sollten in Gruppen von Patienten mit Lippenspalten, Lippen-Kieferspalten und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sowie uni- und bilaterale Spalten untergliedert werden. Das gleiche gilt für Patienten mit Gaumenspalten. Familiäre und nicht familiäre Fälle sollten immer getrennt ausgewertet werden und auch die Medikamenten-, Zigaretten- und Alkoholanamnese sollte detaillierter erfaßt werden als dies bisher in den Studien durchgeführt wurde. Durch derartige Maßnahmen werden Studien vergleichbar und Kandidatengene leichter faßbar. Weitere Ziele sind, die Interaktion der verschiedenen Gene sowie dieser Gene mit Umweltfaktoren (Zigarettenrauchen, Alkohol, Medikamente, mütterlicher Genotyp) zu erforschen. In der vorliegenden Studie wurde getestet, ob das gemeinsame Vorliegen der seltenen Allele der Polymorphismen $wt \rightarrow \Delta 4bp$, D2S443 der $TGF\alpha$ -Genregion und $wt \rightarrow \Delta 6bp$ und $68C \rightarrow T$ des $TGF\beta 3$ -Gens ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung der LKGS darstellt. Aufgrund der geringen Patientenzahl konnte keine signifikante Aussage getroffen werden. Bisher ist nur bekannt, dass der Rezeptor für Retinolsäure (RARA, Retinoid Acid Receptor) mit $TGF\beta 3$ interagiert (Chevenix-Trench et al. 1992; Degitz et al. 1998). Weitere Studien auf diesem Gebiet sind also von großem Interesse.

Vielversprechend scheint auch die Untersuchung der Polymorphismen $677C \rightarrow T$ und $1298A \rightarrow C$ des MTHFR-Gens (5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase) bei Patienten mit LKGS zu sein, da sich das Auftreten von LKGS durch perikonzeptionelle Folsäureeinnahme der Frau senken läßt (Martinelli et al. 2001, Tolarova et al. 1995). Eine Studie über die Beteiligung dieser Polymorphismen an der Genese der LKGS in der deutschen Bevölkerung wird zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe am Institut für Allgemeine Humangenetik der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

Sollten in einigen Jahren die Risikofaktoren für die Entstehung der LKGS bekannt sein, würde dies die Möglichkeit bieten, präventiv tätig zu werden. Das Beispiel $TGF\beta 1$, das bei intravenöser Gabe den Phänotyp der Knockout-Maus verhindern kann, weckt die Hoffnung, dass die Gabe bestimmter Wachstumsfaktoren, Vitamine oder Spurenelemente in der Phase der Gaumenentwicklung bzw. der Verzicht auf Zigarettenrauchen und Alkohol das Auftreten von LKGS verhindern bzw. die Ausprägung verringern kann.

5 Zusammenfassung

Nicht syndromale Lippen-Kiefer-Spalten mit oder ohne Gaumenspalte (LK/GS) und isolierte Gaumenspalten (GS) gehören zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Menschen. Bisher ist über die Ätiologie sehr wenig bekannt. Man geht davon aus, dass es sich um eine multifaktorielle Genese handelt, bei der genetische Faktoren und Umwelteinflüsse zusammenwirken.

Entwicklungsgene, die in mutierter Form in Tiermodellen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten auslösen und zur Zeit der Gaumenentwicklung im Gaumengewebe exprimiert werden, kommen als Kandidatengene der menschlichen Lippen-Kiefer-Gaumenspalten in Betracht. Bei einigen dieser Gene ist bereits das Homolog beim Menschen auf einen Zusammenhang mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten untersucht worden. In der britischen, französischen, und nordamerikanischen Population ist eine 4 bp Deletion ($\Delta 4\text{bp}$) in Intron 5 des $\text{TGF}\alpha$ -Gens mit dem Auftreten von LK/GS assoziiert. Zwei Allele der Mikrosatellitenregion D2S443 in der Nähe des $\text{TGF}\alpha$ -Gens sind in der nordamerikanischen Bevölkerung ebenfalls mit LK/GS assoziiert. Eine 6 bp Deletion ($\Delta 6\text{bp}$) im Promotorbereich des $\text{TGF}\beta 3$ -Gens und das seltene Allel T des Basenaustauschs $68\text{C}\rightarrow\text{T}$ in Intron 4 des $\text{TGF}\beta 3$ -Gens sind in der nordamerikanischen Bevölkerung ebenfalls mit LK/GS assoziiert. Da die genetischen Ursachen der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten populationsspezifisch sein können, sollte diese Arbeit einen Beitrag zur Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten leisten.

In die vorliegende Studie gingen 37 Patienten mit LK/GS und 10 Patienten mit GS, deren Eltern sowie 111 Kontrollpersonen ein. In einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie zeigte sich, dass die Deletion $\Delta 4\text{bp}$ des $\text{TGF}\alpha$ -Gens in der deutschen Bevölkerung mit LK/GS assoziiert ist (P -Wert: 0,02). Dies wurde durch eine familienbasierte Assoziationsstudie (Transmissions Disequilibrium-Test; TDT) bestätigt (P -Wert: 0,04). Im Gegensatz dazu war die Sequenzvariante $\Delta 4\text{bp}$ nicht mit GS assoziiert (P -Wert: 0,15). Der TDT wurde aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit GS nicht durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie entsprechen den Ergebnissen der bereits vorliegenden Studien aus anderen Populationen, obwohl nicht immer der statistisch robustere TDT angewandt wurde. Weder in Fall-Kontroll-Assoziationsstudien noch im TDT war ein Allel der Mikrosatellitenregion D2S443 in der Nähe des $\text{TGF}\alpha$ -Gens mit LK/GS assoziiert (Allel A5: P -Wert: 0,18; TDT: P -Wert: 0,20). Für Patienten mit GS wurde keine statistische Berechnung aufgrund der geringen Patientenzahl

durchgeführt. Die Sequenzvariante $\Delta 6\text{bp}$ des $\text{TGF}\beta 3$ -Gens war in der deutschen Population weder in der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie noch im TDT mit LK/GS assoziiert (P -Wert: 0,94; TDT: P -Wert: 0,66). Ebenso war GS in der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie nicht mit der Sequenzvariante $\Delta 6\text{bp}$ assoziiert (P -Wert: 0,87). Das seltene Allel T des $\text{TGF}\beta 3$ -Gens konnte bei Patienten mit LK/GS nicht nachgewiesen werden, so dass keine statistische Berechnungen vorgenommen wurde. In der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie war GS nicht mit dem Allel T assoziiert (P -Wert: 0,44).

Da $\text{TGF}\beta 3$ zur Zeit der Gaumenfusion im plazentaren Gewebe exprimiert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der Genotyp der Mütter der Patienten mit der Entwicklung einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte des Kindes assoziiert ist. In einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie zeigte sich, dass das Allel T der Punktmutation $68\text{C}\rightarrow\text{T}$ im $\text{TGF}\beta 3$ -Gen bei Müttern ($n = 10$) mit GS des Kindes assoziiert ist (P -Wert: 0,04).

Die Anzahl der in dieser Studie untersuchten Patienten ist zu gering, um eine endgültige Aussage bezüglich einer Beteiligung der Gene $\text{TGF}\alpha$ und $\text{TGF}\beta 3$ an der Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten treffen zu können. Vorrangiges Ziel sollte deshalb sein, diese Studie zu erweitern. Dennoch ist interessant, dass die Assoziation zu der Sequenzvariante $\Delta 4\text{bp}$ des $\text{TGF}\alpha$ -Gens für die deutsche Population bestätigt werden konnte. Der dahinterstehende biologische Mechanismus ist aber noch nicht verstanden.

6 Abkürzungen und Symbole

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Acc.	Identifikationsnummer der GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
CI	Konfidenzintervall
CL/P	Cleft Lip with or without Cleft Palate
CPO	Cleft Palate Only
Δ	Deletion
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
f	Primer forward, 3' → 5'
GS	isolierte Gaumenspalte
In5	Intron 5
kb	Kilobasen
LKGS	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und Gaumenspalte
LK/GS	isolierte Lippen-Kiefer-Spalte mit/ohne Gaumenspalte
MTHFR	5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase
n	Stichprobenumfang
OR	Odds ratio
OMIM	Identifikationsnummer im Online-Katalog der menschlichen Gene und Erbkrankheiten (Online Medelian Inheritance in Man; http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/)
p.A.	per Analysis
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
r	Primer reverse, 5' → 3'
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RCLB	Red Cell Lysis Buffer
SSCA	Single stranded conformational analysis (Einzelstrang-Konformationsanalyse)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TDT	Transmission Disequilibrium Test
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF α	Transforming Growth Factor alpha
TGF β 3	Transforming Growth Factor beta 3
wt	Wildtyp

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und andere physikalische Angaben wurden SI- oder gesetzliche Einheiten benutzt. Die Basen der Nukleinsäuren wurden nach dem gebräuchlichen Einbuchstabencode abgekürzt.

6.2 Symbole

Quadrate symbolisieren männliche, Kreise weibliche Personen



Personen ohne LKGS



Personen mit LKGS

7 Literatur

- Ardinger HH, Buetow KW, Bell GI, Bardach J, VanDenmark DR, Murray JC (1989) Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45:348-353
- Astrup P, Olsen HM, Trolle D, Kjeldsen K (1972) Effect of moderate carbon monoxide exposure on fetal development. *Lancet* 2:1220-1222
- Barrandon Y, Green H (1987) Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The roles of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50:1131-1137
- Basart AM, Qian JF, May E, Murray JC (1994) A PCR method for detecting polymorphism in the TGFA gene. *Hum Mol Genet* 3:678
- Berk M, Desai SY, Heyman HC, Colmenares C (1997) Mice lacking the ski proto-oncogene have defects in neurotation, craniofacial patterning, and skeletal muscle development. *Gene Dev* 11:2029-2039
- Bronsky PT, Johnston MC, Sulik KK (1986) Morphogenesis of hypoxia-induced cleft lip in CL/FR mice. *J Craniofac Genet Dev Biol* 2:113-128
- Brunet CL, Sharpe PM, Ferguson MWJ (1995) Inhibition of TGFβ3 (but not TGFβ1 or TGFβ2) activity prevents normal mouse embryonic palate fusion. *Int J Dev Biol* 39:345-355
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48:137-144
- Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SY (1999) Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest* 103:1641-1650
- Darinici F, Pezzetti F, Scapoli L, Padula E, Baciliero U, Curioni C, Tognon M (1995) Nonsyndromic cleft lip and palate: evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23. *Am J Hum Genet* 56:337-339
- Carpenter G, Cohen S (1979) Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 48:193-296
- Chevenix-Trench G, Jones K, Green A, Martin N (1991) Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 48:1012-1013
- Chevenix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG (1992) Cleft lip with or without cleft palate: Association with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet* 51:1377-1385
- Christensen K, Holm NV, Olsen J, Kock K, Fogh-Andersen P (1992) Selection bias in genetic-epidemiological studies of cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 51:654-659
- Christensen K, Fogh-Andersen P (1993) Cleft lip (+/- cleft palate) in danish twins, 1970-1990. *Am J Med Genet* 47:910-916
- Christensen K, Schmidt MM, Vaet M, Olsen (1995) Absence of an environmental effect on the recurrence of facial-cleft defects. *New Eng J Med* 333:161-164
- Christensen K, Olsen J, Norgaard-Pedersen B, Basso B, Stovrin H, Milhollin-Johnson L, Murray JC (1999) Oral clefts, transforming growth factor alpha genes variants, and maternal smoking: A population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. *Am J Epidemiol* 149:248-255
- Cohen MM, Fraser FC, Gorlin RJ (1990) Craniofacial disorders. In: Emery AEH (ed) *Principles and practice of medical genetics*, Edinburgh London Melbourne and New York, pp 762-796

- Degitz SJ, Morris D, Foley GL, Francis BM (1998) Role of TGFB-3 in RA-induced cleft palate in CD-1 Mice. *Teratology* 58:197-204
- Derynck R (1988) A new type of transforming growth factor- β , TGF β 3. *EMBO J* 7:3737-3743
- Diehl SR, Erickson RP (1997) Genome scan for teratogen-induced clefting susceptibility loci in the mouse: Evidence of both allelic and locus heterogeneity distinguishing cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5231-5236
- Dixon MJ, Garner J, Ferguson MWJ (1991) Immunolocalisation of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth factor alpha (TGFA) during murine palatogenesis in vivo and in vitro. *Anat Embryol* 184:83-91
- Farrall M, Buetow KH, Muray JC (1993) Resolving an apparent paradox concerning the role of TGFA in CL/P. *Am J Hum Genet* 52:434-436
- Feng H, Sassani R, Barlett SP, Lee A HH, Malcom S, Winter RM (1994) Evidence, from family studies, for linkage disequilibrium between TGFA and a gene for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet* 55:932-936
- Ferguson MWH (1987) Palate development: Mechanisms and malformations. *Palate Development* 158:309-315
- Ferguson MWJ (1988) Palate development. *Development* 103:41-60
- Ferguson MWJ (1994) Craniofacial malformations: Towards a molecular understanding. *Nature Genet* 6:329-330
- Fitzpatrick DR, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ (1990) Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development* 109:585-595
- Fletcher O, Kessling AM (1998) MTHFR association with arteriosclerosis vascular disease? *Hum Genet.* 1:11-21
- Grimm G (1990) Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten. In: Schwenzer N, Grimm G (eds) *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Band 2, Spezielle Chirurgie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Han VKM, Hunter ES, Pratt RM, Zenguei JG, Lee DC (1987) Expression of rat transforming growth factor alpha mRNA during development occurs predominantly in the maternal decidua. *Mol Cell Biol* 7: 2335-2343
- Harms V (1998) *Biomathematik, Statistik und Dokumentation: eine leichtverständliche Einführung*. Vol. 7. Harms Verlag, Kiel-Mönckeberg
- Hecht JT, Wang Y, Blanton SH, Michels VV, Daiger SP (1991) Cleft lip and palate: No evidence of linkage to transforming growth factor alpha. *Am J Hum Genet* 49:682-686
- Hecht JT, Blanton SH (1998) *Orofacial clefting: Principles of molecular medicine*. JL Jameson, Totowa, NJ
- Holder SE, Vintiner GM FB, Malcom S, Winter RM (1992) Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 29:390-392
- Hwang SJ, Beaty TH, Panny SR, Street NA, Joseph JM, Gordon S, McIntosh I, Francomano CAA (1995) Association study of transforming growth factor alpha (TGF α) TaqI polymorphism and oral clefts: indication of gene-environment interaction in a population-based sample of infants with birth defects. *Am J Epidemiol* 141:629-636
- Jara L, Blanco R, Chiffelle I, Palomino H, Carreno H (1995) Evidence for an association between RFLPs at the transforming growth factor alpha (locus) and nonsyndromic cleft lip/palate in a south american population. *Am J Hum Genet* 56:339-341

- Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Waburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J (1995) Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genet* 11:415-421
- Khoury MJ, Gomez-Faral M, Mulinare J (1989) Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring? *Am J Dis Child* 143:333-337
- Kreienbrock L, Schach S *Epidemiologische Studien*
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 3. Auflage 2000
- Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T (1994) Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 268:703-710
- Lander ES, Schorck NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-248
- Lane PW, Searle AG, Beechey CV, Eichler E (1981) Chromosome 18 of the house mouse. *J Hered* 72:409-412
- Larsen WJ *Human Embryology*. Vol. 2. Churchill Livingstone, New York
- Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB (1994) Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science* 264:1936-1938
- Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Scheerer H, Shiang R, Naval A (1997) Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 34:1-6
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leyens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV (1998) Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63:557-568
- Lyon MF (1958) Twirler: a mutant affecting the inner ear of the house mouse. *J Embryol Exp Morphol* 6:105-116
- Luettker NC, Qiu TH, Pfeiffer RL, Oliver P, Smithies O, Lee DC (1993) TGF-alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 73:263-278
- Machida J, Yoshiur K, Funkhauser CD, Natsume N, Kawai T, Murray JC (1999) Transforming growth factor alpha (TGFA): Genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics* 61:237-242
- Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, Liang K-Y (1997) Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: Including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 73:337-344
- Marquardt H, Tondaro GJ (1982) Human transforming growth factor: Production by a melanoma cell line, purification and initial characterization. *J Biol Chem* 257:5220-5225
- Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, Bisceglia L (2001) C677T variant form at the MTHFR Gene and CL/P: A risk factor for mothers? *Am J Hum Genet* 98: 357-360
- Mitchell LE, Risch N (1992) Mode of inheritance of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: A reanalysis. *Am J Hum Genet* 51:323-332
- Mitchell LE (1994) Interpreting the evidence for an association between the retinoic acid receptor locus and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *J Med Genet* 99:22-26
- Mitchell LE (1996) Transforming growth factor alpha locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate: a reappraisal. *Genet Epidemiol* 14:231-240

- Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, Slavkin HC, Shuler CF, Derynk R, Werb Z (1999) Epidermal growth factor receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nature Genet* 22:69-74
- Moore GE, Ivens A, Newton R, Balacs MA, Henderson DJ, Jenson O (1990) X chromosome genes involved in regulation of facial clefting and spina bifida. *Cleft Palate J* 27:131-135
- Moore K, Persaud T (1996) *Embryologie*. Vol. 4. Schattauer, Stuttgart
- Murray JC (1995) Face Facts: Genes, environment, and clefts. *Am J Hum Genet* 57:227-232
- Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, Perkins A, Williams T (1998) AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13714-13719
- Orieta M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-879
- Pelton RW, Hogan BLM, Miller DA, Moses HL (1990) Differential expression of genes encoding TGF β 1, β 2, and β 3 during murine palate formation. *J Cell Biol* 115:1091-1105
- Peters H, Neubuser A, Balling R (1997) The role of Pax9 during mouse development. *Dev. Biol.* 186:333
- Pezetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci F, Bodo M, Carinci P, Tognon M (1998) A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation. *Genomics* 50:299-305
- Proetzel G, Pawlowski SG, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J (1995) Transforming growth factor -beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nature Genet* 11:409-414
- Qiu M, Bufone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R (1997) Role of Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2 and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 185: 165-184
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC (1999) Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: Evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59:39-50
- Sadler TW, Langman J (1998) *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467
- Sassani R, Barlett SP, Feng H, Goldner-Sauve A, Haq AK, Buetow KH, Gasser DL (1993) Association between alleles of the transforming growth factor-alpha locus and the occurrence of cleft lip. *Am J Med Genet* 45:565-569
- Satokata I, Maas R (1994) Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genet* 6:348-356
- Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P, Tognon M (1997) Evidence of linkage to 6p23 and genetic heterogeneity in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Genomics* 43: 216-220
- Schaid DJ, Sommer SS (1993) Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies. *Am J Hum Genet* 5:1114-1126

- Schlittgen Einführung in die Statistik
Oldenburg, 3. Auflage 1991
- Schreiber AB, Winkler ME, Cerynck R (1986) Transforming growth factor alpha: A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232:1250-1253
- Schultz GS, White M, Michell R, Brown G, Lynch J, Twardzik DR, Todaro GJ (1987) Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. *Science* 235:350-352
- Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J (1996) Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nature Genet* 14:392-399
- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM (1996) Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 58:551-561
- Shiang R, Lidral AC, Ardinger HH, Buetow KH, Romitti PA, Munger RG, Murray JC (1993) Association of transforming growth factor-alpha gene polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only (CPO). *Am J Hum Genet* 53:836-843
- Shutte BC, Murray JC (1999) The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet* 10:1853-1859
- Spielman RS, Ewens WJ (1996) The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 59:983-989
- Steinwachs EF, Amos C, Mulliken J, Stal S, Hecht JT (2000) Nonsyndromic cleft lip and palate is not associated with cancer or other birth defects. *Am J Med Genet* 90:17-24
- Stoll C, Qian JF, Feingold J, Sauvage P, May E (1992) Genetic variation in transforming growth factor alpha: Possible association of BamHI polymorphism with bilateral sporadic cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 50:870-871
- Strachan T, Read AP (1996) Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Sudbery P (1998) Human Molecular Genetics. In: Wood ED (ed) Cell and molecular biology in action series. Vol. 1. Addison Wesley Longman Limited, Harlow
- Sun D, Vanderburg CR, Odierna GS, Hay ED (1998) TGFB3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development* 125:95-105
- Tanabe A, Taketani S, Endo-Ichikawa Y, Tokunaga R, Ogawa Y, Hiramoto M (2000) Analysis of candidate genes responsible for non-syndromic cleft lip and palate in Japanese people. *Clin Sci* 99:105-111
- Taya V, O'Kane S, Ferguson MWJ (1999) Pathogenesis of cleft palate in TGFB-3 knockout mice. *Development* 126:3869-3879
- Tolarova M (1982) Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. *Lancet* 2:217
- Tolarova MM, Cervenka J (1998) Classification and Birth Prevalence of Orofacial Clefts. *Am J Med Genet* 75:126-137
- Vintiner GM, Lo KK, Holder SE, Winter RM, Malcom S (1993) Exclusion of candidate genes from a role in cleft lip with or without cleft palate: Linkage and association studies. *J Med Genet* 30:773-778
- White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien S, Dean M (1992) Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12:301-306

- Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE (1996) Genetics of nonsyndromic oral clefts revisited. *Cleft Palate Craniof J* 33:406-417
- Wyszynski DF, Maestri N, Lewanda AF, McIntosh I, Smith EA, Garcia-Delgado C, Vingeras-Guarneros E (1997) No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations. *Hum Hered* 47:10

8 Anhang

8.1 Fragebogen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Gaumenspalten für Eltern

Philipps-Universität Marburg

-Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie-

Fragebogen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-Gaumenspaltbildungen für die Mutter

Wir möchten Sie bitten, in Ruhe über unsere Fragen nachzudenken. Je genauer Ihre Angaben sind, desto genauer können wir die Ursachen erforschen. Es ist selbstverständlich, daß alle Ihre Angaben, die Sie machen, der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Vorschriften des Datenschutzes unterliegen. Wir sind natürlich gerne bereit, aufkommende Fragen zu beantworten.

Die Mutter selbst

Spalte
ja nein
☐ ☐

Haben Sie während der Schwangerschaft geraucht? ja nein
☐ ☐

eigene Kinder

Spalte
ja nein unbekannt

Alkohol getrunken? ja nein
☐ ☐

erstes Kind männl./weibl.

☐ ☐ ☐

zweites Kind männl./weibl.

☐ ☐ ☐

drittes Kind männl./weibl.

☐ ☐ ☐

Bemerkungen:

Medikamente eingenommen? ja
nein ☐ ☐

Geschwister der Mutter

Spalte

ja nein unbekannt

1. männl./weibl.

☐ ☐ ☐

deren Kinder 1. m./w. ☐ ☐ ☐
2. m./w. ☐ ☐ ☐

2. männl./weibl.

☐ ☐ ☐

deren Kinder 1. m./w. ☐ ☐ ☐
2. m./w. ☐ ☐ ☐

3. männl./weibl.

☐ ☐ ☐

deren Kinder 1. m./w. ☐ ☐ ☐
2. m./w. ☐ ☐ ☐

4. männl./weibl.

☐ ☐ ☐

deren Kinder 1. m./w. ☐ ☐ ☐
2. m./w. ☐ ☐ ☐

Bemerkungen:

Eltern mütterlicherseits

Spalte

ja nein unbekannt

Vater

☐ ☐ ☐

Mutter

☐ ☐ ☐

Bemerkungen:

Philipps-Universität Marburg

-Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie-

Fragebogen zur Ursachenforschung von Lippen-Kiefer-Gaumenspaltbildungen für den Vater

Wir möchten Sie bitten, in Ruhe über unsere Fragen nachzudenken. Je genauer Ihre Angaben sind, desto genauer können wir die Ursachen erforschen. Es ist selbstverständlich, daß alle Ihre Angaben, die Sie machen, der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Vorschriften des Datenschutzes unterliegen. Wir sind natürlich gerne bereit, aufkommende Fragen zu beantworten.

Der Vater selbst

Spalte

ja nein
☐ ☐

eigene Kinder

Spalte

		ja	nein	unbekannt
erstes Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
zweites Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
drittes Kind	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Bemerkungen :

Geschwister des Vaters

Spalte

		ja	nein	unbekannt		ja	nein	unbekannt
1.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.	männl./weibl.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	deren Kinder	1. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
						2. m./w.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Bemerkungen:

Eltern väterlicherseits

Spalte

	ja	nein	unbekannt
Vater	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mutter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Bemerkungen:

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

An der Philipps-Universität Marburg

Arnold	Griss	Krieg	Schüffel
Aumüller	Grzeschik	Kroll	Schulz
Basler	Habermehl	Kuhn	Schulze
Baum	Happle	Lang	Schwarz
Beato	Hasilik	Lange	Seifart
Bertalanaffy	Hellinger	Lennartz	Seitz
Bien	Hesse	Maisch	Seyberth
Bolm	Hofmann	Moll	Slenczka
Cetin	Joseph	Moosdorf	Steininger
Christiansen	Kern	Mueller	Sturm
Czubayko	Kleine	Oertel	Vohland
Daut	Klenk	Rehder	Voigt
Feuser	Klose	Remschmidt	v. Wichert
Fruhstorffer	Kretschmer	Röhm	Weihe
Gemsa	Krieg	Rothmund	Werner
Geus	Koch	Schachtschabel	Westermann
Gotzen	Koolman	Schäfer	Ziegerl
Gressner	Kretschmer	Schneider	

Am Klinikum Dortmund waren folgende Herren:

Albrecht	Heike	Polonius	Theophil
Böker	Katthagen	Schulze	Wagner
Deitmer	Langendorff	Schwarz	Zander
Frosch	Löhlein	Schwarze	
Hausamen	Lösse	Schwenzer	

8.3 Danksagung

Herrn Prof. Karl-Heinz Grezeschik danke ich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit am Institut für Allgemeine Humangenetik der Philipps-Universität Marburg durchzuführen

Frau Prof. Dr. med. Manuela C. Koch danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre intensive Betreuung während des praktischen Teils meiner Arbeit sowie die stets zügigen Korrekturen meiner Manuskripte.

Mein besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Manuela C. Koch für die liebe und humorvolle Arbeitsatmosphäre:

Gerti Panzner danke ich für die komplette Einarbeitung in die Labormethoden, die wertvollen praktischen Labor-Tipps und die freundliche Unterstützung.

Karolin Stegmann danke ich für ihre fachlich stets hilfsbereite Zusammenarbeit.

Christopher Schwartz danke ich für die Einarbeitung und fachliche Unterstützung bei der Silberfärbung.

Meiner „Mit-Doktorandin“ Birgit Becker für die freundliche Zusammenarbeit während unserer Laborzeit.

Herrn Hartmut Engel danke ich für die Hilfe beim Sequenzieren, bei der automatischen DNA-Fragmentlängenanalyse, sowie der stets geduldigen Unterstützung bei EDV-Problemen.

Herrn Prof. Dr. Dr. K.-H. Austermann danke ich für die Zusammenarbeit mit der Klinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie der Philipps-Universität Marburg

Allen Patienten und Familien möchte ich für die Bereitstellung zur Teilnahme an dieser Studie danken.

Ganz herzlich möchte ich auch meiner Mutter und Freunden für die liebevolle Unterstützung, Motivation und das Korrekturlesen danken.

Die Studie wurde von dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg (Mittel aus dem Forschungspool) finanziell unterstützt.